

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Durchflusszytometrische Epitop-Kartierung von HCMV-spezifischen T-Zellen herz- und lungentransplantierte Patienten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Bodo Hoffmeister
aus Bad Oeynhausen

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk

2. PD Dr. med. Manfred Hummel

3. Prof. Dr. med. Hans-Wilhelm Doerr

Datum der Promotion: 20. Oktober 2003

Abstract

BACKGROUND: Human cytomegalovirus (HCMV) reactivation is still a leading cause of morbidity and mortality among immunosuppressed patients. Uncontrolled viral spread is prevented by an efficient T-cell response. However, little is known about the nature of this T-cell response. In this study we identified epitopes in two immunodominant HCMV-proteins, IE-1 (UL123) and pp65 (UL83), measured the frequencies of T-cells specific for these, and studied the clonotypic composition of selected T-cell responses in a group of HCMV-seropositive heart (n = 17) and lung (n = 3) transplant patients. **METHODS:** For both proteins overlapping pentadecapeptides covering the entire respective amino acid sequences were arranged in pools of 25 peptides each in such a way that every peptide was contained in exactly 3 pools. PBMC were stimulated with the resulting 15 pools for IE-1 or 16 pools for pp65, respectively, as well as with pools containing all peptides of the corresponding protein. Individual peptides leading to a positive T-cell response were identified by flow cytometric detection of intracellular interferon-gamma, each single peptide corresponding to a unique combination of 3 peptide pools. Selected T-cell populations specific for the previously identified single peptides were purified by performing an IFN-gamma secretion assay prior to magnetic cell separation and subsequent fluorescence-activated cell sorting. The clonality of these highly purified peptide-specific T-cell populations was then investigated by a T-cell receptor-gamma rearrangement-PCR and subsequent fragment analysis of fluorescence-labelled PCR amplicates. **RESULTS:** We observed broad heterogeneity among the patients in terms of the immunodominant protein, number of epitopes, predominance of CD4 or CD8 T-cell responses, and epitope-specific T-cell frequencies. 10 previously unknown epitopes were identified, and the HLA-restriction of most of the identified epitopes could be determined. The investigated T-cell responses showed a high degree of clonal focussing. These data were correlated to the patients episodes of HCMV reactivation, but a correlation between differences in the T-cell responses and a different clinical outcome in terms of HCMV-reactivation could not be established. **CONCLUSIONS:** In summary, this novel approach allows the rapid identification of epitopes contained in a given protein, direct determination of T-cell frequencies, and investigation of the T-cell clonality in the CD4 and CD8 T-cell subsets from as little as two times 20 ml of blood. Long-term follow-up of patients at risk for HCMV reactivation and disease may thus allow a more detailed insight into the complexity of the T-cell response to HCMV and may thus lead to improved diagnosis, prophylaxis and therapy.

Key terms: Cytomegalovirus, T-cell epitopes, heart- and lung transplantation, T-cell clones

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die Reaktivierung des Humanen Cytomegalievirus (HCMV) ist immer noch eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität unter immunsupprimierten Patienten. Eine effiziente T-Zell-Antwort vermag die unkontrollierte Ausbreitung des Virus zu verhindern. Vieles über diese T-Zell-Antwort ist aber noch unklar. Im Rahmen dieser Studie wurden daher bei HCMV-seropositiven herz- ($n = 17$) und lungentransplantierten ($n = 3$) Patienten Epitope in zwei wichtigen T-Zell-Zielen, den HCMV-Proteinen IE-1 (UL123) und pp65 (UL83), identifiziert, die Frequenzen der für diese Epitope spezifischen T-Zellen gemessen und die Klonalität ausgewählter starker CD8⁺ T-Zell-Antworten untersucht. **METHODEN:** Dazu wurden Pentadecapeptide, die die gesamte Aminosäure-Sequenz von IE-1 bzw. pp65 umfassten und sich um jeweils 11 Aminosäurereste überlappten, in Pools von 25 bis 30 Peptiden so zusammengefasst, dass jedes Peptid in einer einzigartigen Kombination von drei Pools enthalten war. PBMC der Patienten wurden dann mit den Peptid-Pools stimuliert und die resultierenden T-Zell-Reaktionen durch Färbung von intrazellulär zurückgehaltenem Interferon-gamma durchflusszytometrisch sichtbar gemacht. Immunogene Peptide konnten anhand der jeweiligen drei Pools, die zu IFN-gamma-Produktion führten, eindeutig identifiziert werden. Einige dieser T-Zell-Populationen wurden durch einen IFN-gamma-Sekretions-Assay, magnetische Zellseparation und durchflusszytometrische Feinsortierung aus PBMC isoliert und ihre Klonalität mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis klonal expandierter gamma-T-Zell-Rezeptor-Rearrangements (TCR-PCR) und anschliessender Fragmentanalyse fluoreszenzmarkierter PCR-Amplifikate untersucht. **ERGEBNISSE:** Bei den Patienten bestanden grosse Unterschiede hinsichtlich des jeweils immundominanten Proteins, der Dominanz von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Subpopulation, der antigenen Determinanten, der gemessenen Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen sowie der Anzahl der identifizierten Epitope. Zehn zuvor noch nicht beschriebene Epitope wurden ebenfalls identifiziert und die präsentierenden HLA-Allele der meisten in der Patientengruppe identifizierten Epitope bestimmt. Die mittels TCR-PCR untersuchten CD8⁺ T-Zell-Reaktionen waren auf einen oder wenige Klone fokussiert. Die Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Verläufen der Patienten hinsichtlich HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung erbrachte jedoch keine Hinweise auf einen konkreten Zusammenhang. **SCHLUSSFOLGERUNGEN:** Zusammenfassend ermöglichen die hier vorgestellten Methoden die Untersuchung des Langzeitverlaufes der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen immundominante Proteine auf Epitop-Ebene nach initialer Identifizierung der antigenen Determinanten, die direkte Bestimmung der Frequen-

zen der Epitop-spezifischen T-Zellen sowie die Untersuchung der Klonalität dieser Reaktionen aus ca. 2 x 20 ml Blut. Die Langzeit-Untersuchung von Patienten mit hohem Risiko für HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung kann so zu einem besseren Verständnis der komplexen HCMV-spezifischen T-Zell-Anwort und damit möglicherweise auch zur Verbesserung von Diagnose, Prophylaxe und Therapie dieser Patienten beitragen.

Schlagworte: Humanes Cytomegalievirus (HCMV), T-Zell-Epitope, Herz- und Lungen-transplantation, T-Zell Klone

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Die HCMV-Infektion	6
1.1.1.	Pathogenese	6
1.1.2.	Klinische Manifestationen.....	9
1.1.3.	Diagnose	10
1.1.4.	Therapie	11
1.2.	Die Rolle von T-Zellen in der Kontrolle von HCMV	12
1.3.	Aufgaben und (mögliche) Anwendungen der durchflusszytometrischen T-Zell-Epitop-Kartierung.....	14
2.	Problemstellung	16
3.	Materialien und Methoden.....	18
3.1.	Materialien	18
3.1.1.	Patienten- und Probandenmaterial.....	18
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.3.	Chemikalien, Medium, Lösungen, Puffer	21
3.1.4.	Monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper und -Antikörperkonjugate	22
3.1.5.	Antigene: Einzelpeptide, Peptidpools, virales Lysat	22
3.2.	Verwendete Geräte und Software.....	23
3.2.1.	Verwendete Geräte	23
3.2.2.	Verwendete Software	23
3.3.	Methoden.....	26
3.3.1.	Zellpräparation	26
3.3.2.	Antigen-Stimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung unter Verwendung von Vollblut.....	26
3.3.3.	Antigen-Stimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung unter Verwendung von PBMC	27
3.3.4.	Nachtestung einzelner Peptide mit und ohne Zusatz kostimulatorischer Antikörper ...	29
3.3.5.	Durchflusszytometrische Analyse	29
3.3.6.	Methoden der T-Zell-Epitop-Kartierung	31
3.3.7.	Vβ-Typisierung Peptid-spezifischer T-Zell-Reaktionen	31
3.3.8.	IFN-γ-Sekretions-Assay, MACS und durchflusszytometrische Feinsortierung	33
3.3.9.	TCR-γ1/2-PCR und FFA	34
3.3.10.	Vorhersage der jeweils wahrscheinlichsten präsentierenden HLA-Allele und immunogenen Nonamer-Sequenzen stimulierender Peptide.....	35
4.	Ergebnisse	39
4.1.	Ergebnisse der methodischen Arbeiten	39
4.1.1.	Antikoagulanzenvergleich in Vollblut und PBMC	39
4.1.2.	Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Antigene in Vollblut und PBMC	41
4.1.3.	T-Zell-Reaktionen mit und ohne kostimulatorische Antikörper	43
4.1.4.	Isotyp-Kontrollen und Positiv-Kontrollen mit PMA/Ionomycin	43
4.1.5.	T-Zell-Epitop-Kartierung mit dreidimensionalem Peptidpool-Design	44

4.2.	Ergebnisse von T-Zell-Epitop-Kartierung und Klonalitätsanalyse.....	45
4.2.1.	Übersicht über die Ergebnisse der T-Zell-Epitop-Kartierung	45
4.2.2.	T-Zell-Epitopkartierungen und Restriktionsanalyse von IE-1.....	49
4.2.3.	T-Zell-Epitopkartierungen und Restriktionsanalyse von pp65.....	56
4.2.4.	Untersuchung der Klonalität Peptid-spezifischer CD8+ T-Zell-Reaktionen	58
4.3.	Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit HCMV-Reaktivierung und -	
	Erkrankung der Patienten.....	64
5.	Diskussion.....	66
5.1.1.	Die T-Zell-Antwort gegen IE-1 und pp65 ist komplex strukturiert	66
5.2.	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der methodischen Arbeiten	66
5.2.1.	Ein definitives Versuchsprotokoll für die intrazelluläre Zytokinfärbung.....	66
5.2.2.	T-Zell-Epitop-Kartierung mit dem neuem Peptidpool-Design	69
5.2.3.	Weitere methodische Arbeiten	70
5.3.	Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen von T-Zell-Epitop-Kartierung und	
	Untersuchungen zur T-Zell-Klonalität.....	71
5.3.1.	Bedeutung Peptid-spezifischer T-Zell-Frequenzen	71
5.3.2.	Bedeutung des immundominanten Proteins	72
5.3.3.	Anzahl der identifizierten Epitope und Subpopulationen der Epitop-spezifischen T-Zellen	72
5.3.4.	Bedeutung des HLA-Typs für die Reaktivität.....	73
5.3.5.	Bedeutung von IE-1 und pp65.....	74
5.3.6.	Verwendung von Vorhersagen	74
5.4.	Schlussfolgerungen aus der Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit	
	HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung.....	76
5.4.1.	Klinische Implikationen der gemachten Beobachtungen	76
5.4.2.	Resümé	78
6.	Literaturverzeichnis.....	80

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Struktur, Genom und Replikationszyklus von HCMV	7
Abb. 2:	Bindungsanker von an HLA-A*0201-präsentierten Peptiden	14
Abb. 3:	Verteilung der HLA-Allele in der Patientengruppe	20
Abb. 4:	Durchflusszytometrische Analyse HCMV-spezifischer T-Zell-Reaktionen	30
Abb. 5:	T-Zell-Epitopkartierung mit dem dreidimensionalen Peptidpool-Design	32
Abb. 6:	Antikoagulanzenvergleich in Vollblut und PBMC	40
Abb. 7:	Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Antigene in Vollblut und PBMC	42
Abb. 8:	T-Zell-Reaktionen mit und ohne kostimulatorische Antikörper	44
Abb. 9:	Beispiel einer T-Zell-Epitop-Kartierung von IE-1	46
Abb. 10:	Beispiel einer T-Zell-Epitop-Kartierung von pp65	47
Abb. 11:	Synopse der bisher identifizierten CD4+ und CD8+ Epitope in IE-1	53
Abb. 12:	Synopse der bisher identifizierten CD4+ und CD8+ Epitope in pp65	54
Abb. 13:	Beispiel einer V β -Typisierung einer Peptid-spezifischen CD8+ T-Zell-Reaktion	61
Abb. 14:	Beispiel der Sortierung einer Peptid-spezifischen CD8+ T-Zell-Reaktion	62
Abb. 15:	Übersicht über die Ergebnisse der TCR- γ 1/2-PCR und FFA	63
Abb. 16:	Verlauf HCMV-spezifischer T-Zell-Frequenzen auf Epitop-Ebene	72

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Klinische Manifestationen der HCMV-Erkrankung	9
Tab. 2:	Charakteristika der Patientengruppe	19
Tab. 3:	Verwendete Antikörper und Antikörperkonjugate	22
Tab. 4:	Aminosäure-Sequenzen der verwendeten IE-1-Pentadecapeptide	24
Tab. 5:	Aminosäure-Sequenzen der verwendeten pp65-Pentadecapeptide	25
Tab. 6:	Reaktivitäten gesunder Probanden gegen IE-1-Pentadecapeptide, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden	35
Tab. 7:	Reaktivitäten gesunder Probanden gegen pp65-Pentadecapeptide, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden	36
Tab. 8:	T-Zell-Reaktionen auf IE-1 und pp65 in der Patientengruppe	48
Tab. 9:	Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-I-Allele und immunogene Nonamere in IE-1-Peptiden, die CD8+ T-Zell-Antworten induzierten	50
Tab. 10:	Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-I-Allele und immunogene Nonamere in pp65-Peptiden, die CD8+ T-Zell-Antworten induzierten	50
Tab. 11:	Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-II-Allele von pp65-Peptiden, die CD4+ T-Zell-Antworten induzierten	52
Tab. 12:	Neu identifizierte IE-1- und pp65-Epitope	56
Tab. 13:	Peptide, die von mehr als einen HLA-Allel präsentiert wurden	58
Tab. 14:	Gruppeneinteilung der Patienten nach Ausmass der HCMV-Reaktivierung	64
Tab. 15:	Explorative Statistik	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Begriff
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BFA	Brefeldin A, Sekretionshemmer aus <i>Penicillium brefeldianum</i>
BIMAS	„BioInformatics & Molecular Analysis Section“ des NIH = online-Datenbank zur T-Zell-Epitop-Vorhersage
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CD	„Cluster of differentiation“ = internationale Nomenklatur zellulärer Oberflächenmarker
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ = Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	„Ethyldiamin tetraic acid“ = Ethyldiamin tetra-Essigsäure
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
FACS	„Fluorescence-activated cell sorting“ = Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung bzw. -analyse
FCS	„Fetal calf serum“ = Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	„Forward scatter“ = Vorwärtstreulicht
g	Einheit der relativen Zentrifugalkraft
GPT	Gigapartikel (10 ⁹ /l)
h	Stunde(n)
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV-5	Humanes Herpesvirus 5
HIV	„Human immunodeficiency virus“ = Humanes Immundefizienzvirus
HLA	„Human leukocyte antigen“ = Humanes MHC Molekül
HLA-DR	MHC-II Molekül
HSV	Herpes-simplex-Virus
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus
i.A.	im Allgemeinen
IE-1	„Immediate early 1 protein“ = regulatorisches HCMV-Protein (UL123)
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Il	Interleukin
IMEG	„intramyokardiale Elektrographie“
inkl.	inklusive
I.U.	„International unit“ = Internationale Einheit
KMT	Knochenmarkstransplantation
MACS	„Magnetic-activated cell sorting“ = Magnetische Zellseparation
mAk	Monoklonale Antikörper

Abkürzung	Vollständiger Begriff
min.	Minuten
ml	Milliliter (10^{-3} l)
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)
μ g	Mikrogramm (10^{-3} gr.)
MHC-I/II	„Major histocompatibility complex“ = Haupthistokompatibilitätskomplexe
mRNA	„Messenger ribonucleic acid“ = Boten-Ribonukleinsäure
NaN ₃	Natriumazid
NIH	„National Institute of Health“ = Nationale Gesundheitsbehörde der USA
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle
orf	„open reading frames“ = offene Leseraster
PBMC	„Peripheral blood mononuclear cells“ = Periphere blutmononukleäre Zellen
PBS	„Phosphate buffered saline“ = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-12-Acetat
pp65	Phosphoprotein 65 = HCMV-Protein (UL83)
Pt-2	Zweiter eingeschlossener Patient
Pr-1	Proband 1
S.	Seite
SSC	„Sideward scatter“ = Seitwärtsstreulicht
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
sog.	sogenannt
SYFPEITHI	online-Dantenbank zur T-Zell-Epitop-Vorhersage
Tab.	Tabelle
TCR	„T-cell-receptor“ = T-Zell-Rezeptor
TCR- γ -1/2-PCR	T-Zell-Rezeptor-gamma-Rearrangement-PCR
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	„Volume per volume“ = Volumen pro Volumen
w/v	„Weight per volume“ = Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Tabelle des Einzel-Buchstaben-Codes für Aminosäuren (AS)

Code	Aminosäure	Gruppe	Code	Aminosäure	Gruppe
G ¹	Glycin	aliphatische AS	D	Aspartat	saure AS
A	Alanin	aliphatische AS	N	Asparagin	saure AS
S	Serin	aliphatische AS	E	Glutamat	saure AS
T	Threonin	aliphatische AS	Q	Glutamin	saure AS
V	Valin	aliphatische AS	C	Cystein	schwefelhaltige AS
L	Leucin	aliphatische AS	M	Methionin	schwefelhaltige AS
I	Isoleucin	aliphatische AS	F	Phenylalanin	aromatische AS
P	Prolin	heterozyklische AS	Y	Tyrosin	aromatische AS
W	Tryptophan	heterozyklische AS	R	Arginin	basische AS
H	Histidin	heterozyklische AS	K	Lysin	basische AS

¹Aminosäuren und Peptide sind in dieser Arbeit in der Schriftart Courier New gehalten

Zusammenfassung

Die Primärinfektion oder Reaktivierung des Humanen Cytomegalievirus (HCMV) stellt bei immunsupprimierten Patienten nach wie vor ein grosses klinisches Problem dar. Doch nicht bei allen. Bei Patienten mit vergleichbarem Ausmaß an Immunsuppression kommt es bei einigen zu z.T. schweren klinischen Manifestationen oder gar zum Tod durch HCMV, während die Reaktivierung bei anderen asymptomatisch bleibt. In einer dritten Gruppe von Patienten werden überhaupt keine Reaktivierungen dokumentiert. T-Zellen spielen bei der Kontrolle der Infektion eine zentrale Rolle. Die Untersuchung der T-Zell-Antwort in einer Patientengruppe mit hohem Risiko für HCMV-Reaktivierung bzw. -Erkrankung bietet die Möglichkeit, die Ursachen für diese unterschiedlichen klinischen Verläufe zu analysieren. Ein besseres Verständnis der antiviralen T-Zell-Antwort und der damit verbundenen pathogenetischen Implikationen könnte Diagnostik, Prophylaxe und Therapie der HCMV-Infektion möglicherweise entscheidend verbessern. In dieser Arbeit wurden deshalb drei Ziele verfolgt: (1) Die Etablierung von Techniken, die die vollständige T-Zell-Epitop-Kartierung immundominanter Proteine und die Analyse der T-Zell-Reaktionen auf klonaler Ebene aus einem Minimum an Material ermöglichen sollten. (2) Die Anwendung dieser Techniken in einer Gruppe herz- und lungentransplantierte Patienten, um die T-Zell-Antwort gegen die beiden wahrscheinlich wichtigsten Ziele im HCMV, IE-1 und pp65, detailliert zu untersuchen und so mehr über die Gesetzmäßigkeiten dieser Antwort zu lernen. (3) Die Untersuchung auf mögliche Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen klinischen Verläufen im Hinblick auf HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung dieser Patienten und den beobachteten interindividuellen Unterschieden in der Struktur der T-Zell-Antwort. Für die Epitop-Kartierung wurden Pentadecapeptide, die die gesamte Aminosäure-Sequenz von IE-1 bzw. pp65 umfassten und sich um jeweils 11 Aminosäurereste überlappten, in Pools von 25 bis 30 Peptiden in einer Weise zusammengefasst, dass jedes Peptid in einer einzigartigen Kombination von drei Pools enthalten war („dreidimensionales Peptidpool-Design“). Dieses Design erlaubte ein Minimum an Ansätzen zur Epitop-Identifizierung - mit weniger als 17 ml Vollblut konnte eine komplette Kartierung erfolgen. Nach 6-stündiger Stimulation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) der Patienten mit diesen Peptid-Pools wurden T-Zell-Reaktionen durch Färbung von intrazellulär zurückgehaltenem Interferon- γ (IFN- γ) sichtbar gemacht. Immunogene Peptide konnten dann anhand der jeweiligen Kombination von drei Pools, die zur Produktion von IFN- γ führten, eindeutig identifiziert werden. Ausserdem

wurde die Klonalität ausgewählter starker CD8⁺ T-Zell-Antworten auf einzelne IE-1- und pp65-Peptide untersucht. Dazu wurden die Peptid-spezifischen T-Zell-Populationen durch einen IFN- γ -Sekretions-Assay, magnetische Zellseparation (MACS) und durchflusszytometrische Feinsortierung aus PBMC isoliert und ihre Klonalität mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis klonal expandierter γ -T-Zell-Rezeptor-Rearrangements (TCR- γ -1/2-PCR) und anschliessender Fragmentanalyse fluoreszenzmarkierter PCR-Amplifikate (FFA) untersucht. Diese Methode erwies sich als sehr effektiv: schon geringe Zellzahlen (ca. 1×10^3 Zellen) waren für eine erfolgreiche PCR-Analyse ausreichend. Die so untersuchten CD8⁺ T-Zell-Reaktionen waren auf einen oder wenige T-Zell-Klone fokussiert. Die Struktur der analysierten T-Zell-Antworten war komplex: bei den Patienten bestanden grosse Unterschiede hinsichtlich des im-mundominanten Proteins, der Dominanz von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Subpopulation, der anti-genen Determinanten, der gemessenen Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen, sowie der Anzahl der identifizierten Epitope. Anschliessend wurden die HLA-Typen von Patienten und in voran-gegangenen Projekten untersuchten gesunden Probanden, die auf gleiche Peptide reagierten, auf Übereinstimmungen untersucht. Ergänzend wurde für jedes identifizierte Peptid eine Bindungs-motiv-Analyse mit Hilfe von zwei online-Datenbanken zur Vorhersage von T-Zell-Epitopen durchgeführt („SYFPEITHI“ und BioInformatics & Molecular Analysis Section des NIH, kurz „BIMAS“). Auf diese Weise konnten die jeweils wahrscheinlichsten präsentierenden HLA-Allele und die immunogenen Nonamere für den grössten Teil der immunogenen Peptide be-stimmt werden. Für eine Reihe von Peptiden zeigte sich dabei, dass sie von verschiedenen HLA-Allelen präsentiert wurden. Zehn zuvor noch nicht beschriebene Epitope wurden ebenfalls identi-fiziert. Die Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Verläufen der Patienten hinsichtlich HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung erbrachte jedoch noch keine Hinweise auf einen konkreten Zusammenhang, was wahrscheinlich durch die Komplexität der Antworten und die dafür zu geringe Patientenzahl bedingt war. Patienten mit starken T-Zell-Reaktionen gegen IE-1 schienen aber besser vor HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung geschützt zu sein. Zu-sammenfassend ermöglichen die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden die Untersuchung des Langzeitverlaufes der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen im-mundominante Proteine auf Epitop-Ebene nach initialer Identifizierung der antigenen Determinanten. Die Klonalität dieser Reaktionen kann ebenfalls relativ einfach analysiert werden. Weil nur wenig Blut für diese Un-tersuchungen erforderlich ist, können sie auch bei Patienten mit einem hohen Risiko für HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung angewendet werden. Dadurch wurde die experimentelle Basis geschaffen, um durch eingehende Untersuchungen der komplexen HCMV-spezifischen T-Zell-

Anwort möglicherweise Hinweise für die Verbesserung von Diagnose, Prophylaxe und Therapie dieser Patienten zu erhalten.

1. Einleitung

Mit einem Genom von ca. 230.000 Basenpaaren, die vermutlich für mehr als 227 verschiedene Proteine kodieren [1], ist das Humane Cytomegalievirus (HCMV) der größte Vertreter aus der Gruppe der Herpesviren. Die Komplexität seines Genoms ermöglichte es diesem Virus, im Laufe der Evolution ein umfangreiches Repertoire an Mechanismen zu entwickeln, um sich dem Zugriff des menschlichen Immunsystems effektiv entziehen zu können. Ergebnis dieser sog. Immunevasionsstrategien ist die Etablierung einer persistierenden Infektion (Latenz): einmal infiziert, kann der Organismus das Virus nie wieder vollständig eliminieren. Die Anforderungen an das Immunsystem, dennoch die Kontrolle über das Virus zu behalten, sind dementsprechend komplex. Die Tatsache, dass die HCMV-Infektion beim Immunkompetenten klinisch völlig inapparent bleibt, zeigt aber, dass es diesen Anforderungen gerecht wird, auch wenn Reaktivierungen des Virus offensichtlich häufiger vorkommen, als bislang angenommen wurde [2, 3]. Anders ist die Situation jedoch, wenn das Immunsystem nicht vollständig ausgebildet oder (zeitweise) in seiner Funktion beeinträchtigt ist. So ist HCMV als nach wie vor häufigste kongenitale Infektion für z.T. schwere embryofetale Missbildungen verantwortlich. Darüber hinaus kann die Reaktivierung von HCMV bei immunsupprimierten Patienten zu einem breiten Spektrum mitunter schwerer Erkrankungsbilder, nicht selten auch zum Tod der Betroffenen, führen. Unter Herztransplantierten beispielsweise stellt HCMV immer noch die wichtigste infektiöse Ursache von Morbidität und Mortalität dar [4].

Welch zentrale Rolle das zelluläre Immunsystem, und v.a. die T-Zellen, bei der Kontrolle der HCMV-Infektion einnehmen, wurde schon Anfang der 80er Jahre bei Knochenmarktransplantations-(KMT)-Patienten gezeigt [5, 6]. Zunächst am Maus-Modell etabliert [7, 8], konnte der adoptive Transfer HCMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen diese Patienten effektiv vor der Entwicklung einer HCMV-Erkrankung schützen [9, 10]. Auch für CD4⁺ T-Zellen wurde eine essentielle Rolle beim Schutz vor der HCMV-Erkrankung demonstriert [11]. Inzwischen werden Versuche unternommen, durch adoptiven Transfer von antigen-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Patienten insbesondere in den ersten 90 Tagen nach Transplantation besser zu schützen [12]. Als Hauptziel dieser HCMV-spezifischen T-Zellen galt anfangs das regulatorische immediate early 1 protein (IE-1, UL123) [13, 14, 15]. Dafür sprach, dass dieses Protein das am stärksten exprimierte Genprodukt der sehr frühen (immediate early) Infektionsphase ist [16] und hohe Frequenzen IE-1-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut HCMV-seropositiver gesunder Probanden nachgewiesen werden konnten [13, 14], die in der Lage waren, infizierte Fibroblasten

noch vor Ablauf des Replikationszyklus *in vitro* zu zerstören [17]. Dann aber wurde ein weiteres wichtiges T-Zell-Ziel in HCMV identifiziert: das Matrix-Phosphoprotein pp65 [18, 19]. Dieses Strukturprotein, das die Hauptmasse des Teguments von HCMV bildet, wird nach der Penetration zusammen mit dem Virion in die Zelle transportiert und T-Zellen bereits vor der viralen Genexpression präsentiert [19, 20]. pp65 ist auch der Hauptbestandteil der sog. „dense bodies“ [21]. Die starke Präsenz von pp65 in infizierten Zellen erklärt, warum dieses Protein einerseits so nützlich als Antigen für die immunzytologische Diagnostik ist und andererseits ein wesentliches Ziel für CD8⁺ T-Zellen darstellt. Demgemäss wurden hohe Frequenzen von pp65-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut gesunder HCMV-seropositiver Probanden beobachtet [22]. Wills und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die CD8⁺ T-Zell-Antwort einiger dieser Probanden auf wenige oder nur ein einziges Epitop in diesem Protein fokussiert ist [22]. Diese Peptidspezifischen T-Zell-Populationen bestanden zudem aus nur wenigen oder einem einzigen Klon. Wills und Mitarbeiter folgerten daraus, dass diese Klone *in vivo* stark expandiert sein mussten [23, 24, 25]. Ähnliches konnte auch für pp65-spezifische CD4⁺ T-Zellen demonstriert werden [26].

Dennoch sind die Kenntnisse über die T-Zell-Antwort gegen HCMV lückenhaft. Gleichzeitig wird immer deutlicher, wie komplex diese Antwort ist: mittlerweile ist eine Vielzahl verschiedener Epitope in IE-1 und pp65 beschrieben worden [15, 22, 27-41]. Über die Immundominanz des einen oder des anderen Proteins wird weiterhin kontrovers diskutiert [37]. Zunehmend widmet man sich auch der Identifikation antigenener Determinanten in anderen immunogenen HCMV-Proteinen wie gB (UL55), pp150 (UL32) oder pp28 (UL98) [42]. Schliesslich wurde mehrfach die funktionelle Heterogenität HCMV-spezifischer T-Zellen demonstriert, die sich in unterschiedlichen Effektormechanismen und Oberflächen-Phänotypen spiegelt [43, 44, 45]. Dank der Kenntnis verschiedener pp65-Epitope konnte vor kurzem ein erstes Immunmonitoring auf der Ebene Epitop-spezifischer T-Zellen bei KMT-Patienten durchgeführt und eine starke positive Korrelation zwischen der Rekonstitution dieser Zellen nach Transplantation und dem Schutz vor HCMV-Erkrankung gezeigt werden [46, 47].

Trotz allem bleibt weiterhin unklar, warum bei Patienten mit vergleichbarem Ausmass an Immunsuppression es bei manchen zu einer symptomatischen HCMV-Erkrankung kommt, während die Infektion bei anderen auf eine asymptomatische Replikation beschränkt bleibt und klinisch stumm verläuft oder überhaupt keine Replikation beobachtet wird. So bestehen bisher auch keine verlässlichen Möglichkeiten zur Vorhersage, welche Patienten ein besonders hohes Risiko haben, an HCMV zu erkranken.

1.1. Die HCMV-Infektion

1.1.1. Pathogenese

HCMV, das humane Herpesvirus Typ 5 (HHV5), gehört zur Familie der Herpesviridae und besitzt die für diese Gruppe typische Struktur: das vollständige Virus besteht aus einer Phospholipidmembran (Envelope) mit membranständigen Glykoproteinen, einer aus verschiedenen Proteinen bestehenden Matrix (Tegument) und dem ikosaedrischen Nukleokapsid (core), das eine mit Polyaminen assoziierte lineare Doppelstrang-DNA (dsDNA) umschliesst (Abb. 1A, S.7). Mit über 200 offenen Leserahmen („open reading frames“, orfs), die wahrscheinlich für ebenso viele Genprodukte kodieren, besitzt es das grösste Genom aller Herpesviren (Abb. 1B). Diese Genprodukte sind nach ihrer Lokalisation im Genom bezeichnet (z.B. UL83: pp65-Gen; UL123: IE-1-Gen, vgl. Abb. 1). Nach Infektion der Zelle und Proteolyse des Kapsids („Adsorption, Penetration, Uncoacting“) wird die virale DNA zusammen mit Matrixproteinen in den Zellkern transportiert, wo die Replikation erfolgt (DNA-Replikation, Abb. 1C) [48]. Der ca. 24 h dauernde Replikationszyklus von HCMV [49] gliedert sich in drei zeitlich streng organisierte Abschnitte und beginnt mit der Aktivierung der Transkription sog. immediate early(IE)-Gene durch das im Zellkern vorhandene pp65. Die am stärksten exprimierten Proteine dieser sehr frühen Infektionsphase sind die Phosphoproteine IE-1 und IE-2 (UL122), die in der Regulation der Transkription viraler und zellulärer Gene eine zentrale Rolle spielen. In der E(early)-Phase werden v.a. zur DNA- und Proteinsynthese benötigte Proteine, wie die virale DNA-Polymerase (UL54), hergestellt. Auch die Produktion von pp65 beginnt bereits in der E-Phase. Nach DNA-Synthese und Produktion der Genprodukte der L(late)-Phase, hauptsächlich Strukturproteine, kommt es im Kern zum Viruszusammenbau („Assembly“). Von der Kern- oder Zellmembran erhält das Virus schließlich seine Hülle („Budding“), bevor es freigesetzt wird („Release“). Die Infektion kann dabei sowohl latent als auch lytisch ablaufen. Verläuft sie lytisch, führt die Virusreplikation zu charakteristischen zytopathologischen Veränderungen. Dazu gehören die ausgeprägte Vergrößerung („Cytomegalie“) der Zelle, die dem Virus seinen Namen verlieh, wie die Bildung intranukleärer Einschlusskörper, die von einem hellen Hof umschlossen sind und zu der Bezeichnung „Eulenaugenzellen“ geführt haben (diese Zellveränderung ist pathognomonisch für HCMV). Im späteren Verlauf der Infektion treten im Zytoplasma auch die sog. „dense bodies“ auf.

Im Allgemeinen ist ein immunkompetenter Wirt jedoch in der Lage, die Infektion rasch einzudämmen [37]. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus vor allem in myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark in latenter Form. Das Virusgenom ist dabei nicht in die DNA der

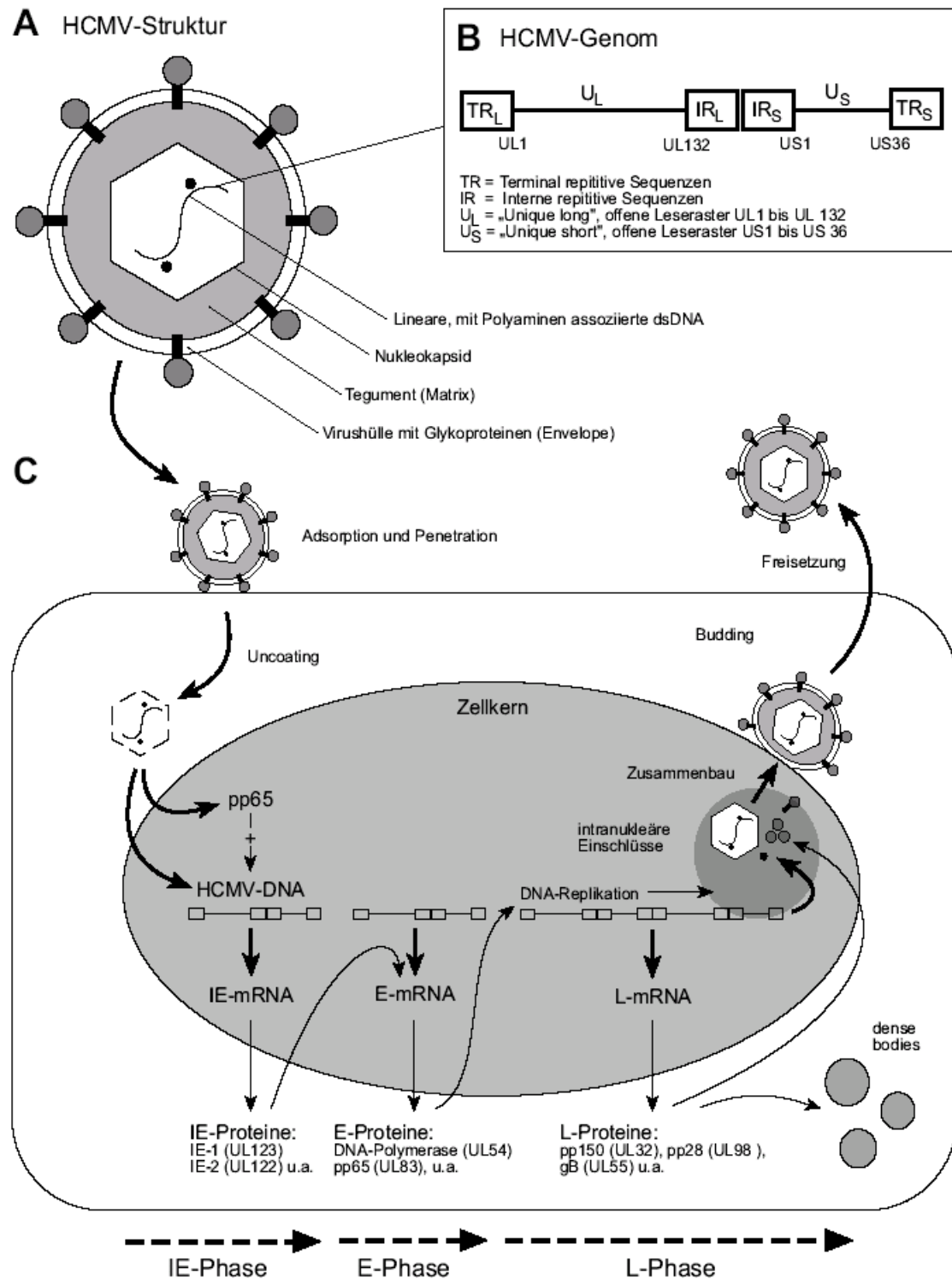


Abbildung 1 Struktur, Genom und Replikationszyklus von HCMV. Wie andere Vertreter der Herpesvirusgruppe besteht HCMV aus einer linearen, mit Polyaminen assoziierten dsDNA, die von einem ikosaedrischen Nukleokapsid, einer Matrix und einer verschiedene Glykoproteine enthaltenden Lipidmembran umgeben ist (A). Das ca. 235.000 Basenpaare grosse Genom besteht aus einer langen (U_L) und einer kurzen (U_S) Untereinheit, die jeweils von repetitiven Sequenzen flankiert sind (B). Der Replikationszyklus (C) gliedert sich in die immediate early (IE)-, early (E)- und late (L)-Phase. Durch die Infektion kommt es zu charakteristischen Veränderungen der Zelle: intranukleäre Einschlüsse an Orten des Viruszusammenbaus im Zellkern und „dense bodies“ im Zytoplasma (C) sowie Vergrößerung („Cytomegalie“) der gesamten Zelle. Modifiziert nach [48]

Wirtszelle integriert; die Expression viraler latenzassoziierter Gene (wie bei EBV, HSV) ist bisher nicht bekannt. Ohne Produktion signifikanter Mengen viraler Genprodukte ist das Immunsystem allerdings auch nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren - Ergebnis ist eine persistierende Infektion. Vom Knochenmark aus findet die Verbreitung durch im Blut zirkulierende Monozyten statt. Doch erst die Differenzierung zu Makrophagen unter dem Einfluss von Zytokinen wie IFN- γ in peripheren Geweben ermöglicht dem Virus die Replikation [50]. Weitere Orte der Persistenz sind duktale Epithelien verschiedener Gewebe, u.a. der Speicheldrüsen, Nierentubuli, des Darmes, von Cervix, Hoden und Nebenhoden [50]. Die Primärinfektion erfolgt deshalb v.a. durch Speichel, Urin, Cervix- und Vaginalsekret, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Stuhl oder Tränenflüssigkeit, aber auch iatrogen durch Übertragung von Blut, Blutprodukten oder transplantierten Organen HCMV-seropositiver Spender. Die Primärinfektion kann kongenital erfolgen; häufig findet sie aber perinatal bzw. im Kindes- oder jungen Erwachsenenalter statt. Dazu ist eine prolongierte Exposition erforderlich. Auch Ko- bzw. Reinfektionen mit unterschiedlichen Virusstämmen kommen vor. Es gibt nur einen HCMV-Serotyp, aber eine Vielzahl unterschiedlicher Virus-Stämme (Laborstämme wie AD169, Towne, Davis, klinische Isolate wie Toledo usw.), deren Sequenz-Homologie auf ca. 80 % geschätzt wird [51]. Für die Seroprävalenz von HCMV findet man stark variierende Angaben; sie ist abhängig von der untersuchten Population und dem verwendeten diagnostischen Test, wird aber häufig für Europa mit 60 bis 70 % angegeben [52]. Einmal etabliert, bleibt die Infektion lebenslang bestehen. Dies ist v.a. auf das vielfältige Repertoire von Immunevasionsstrategien von HCMV zurückzuführen. Dazu zählen Mechanismen, die mit dem MHC-Klasse-I- und dem MHC-Klasse-II-Präsentationsweg der Wirtszelle und somit dem Zugriff durch T-Zellen interferieren, die Kodierung eines auf der Zellmembran exprimierten MHC-Klasse-I-Homologs (als Schutz vor NK-Zellen), die Interaktion mit Komplementfaktoren, die Produktion von Interleukin-(IL-) und Chemokin-Homologen sowie die Modulation von Signaltransduktion, Transkription u.a. Zellfunktionen [53]. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch, das nach Gilbert und Mitarbeitern [54] pp65 Kinase-Aktivität besitzt und dadurch in der Lage sein könnte, die MHC-Klasse-I-Präsentation von IE-1-Peptiden zu behindern. Dennoch gelingt es dem Immunsystem, die Kontrolle über das Virus zu gewinnen - und zu behalten - sofern nicht Beeinträchtigungen des zellulären Immunsystems, wie z.B. durch Leukämien und Lymphome, Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) oder im Rahmen einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation, dem Virus Gelegenheit zu Reaktivierung und Replikation geben. Dabei bereitet die Immunsuppression der Reaktivierung nicht allein, sondern in Verbindung mit chronischer Antigenstimulation und Aktivierung des Immunsystems

(z.B. durch hohe Plasmaspiegel an Tumor-Nekrose-Faktor- α , TNF- α , infolge Abstossung, Sepsis, ATG-Gabe usw.), den Boden [55, 56]. Eine Organtransplantation erfüllt alle diese Kriterien. Der Einsatz potenter Suppressoren der T-Zell-vermittelten Immunität wie Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) oder des monoklonalen anti-CD3-Antikörpers OKT3 ist dabei mit einer besonders hohen Rate an HCMV-Reaktivierungen und Erkrankungen assoziiert.

1.1.2. *Klinische Manifestationen*

Die Primärinfektion oder Reaktivierung von HCMV können zu einem breiten Spektrum klinischer Manifestationen führen. Diese sind in Tabelle 2 dargestellt. Die bei Patienten nach Herz- und Lungentransplantation besonders häufigen Manifestationen sind mit (*) gekennzeichnet. Unter Transplantations-Patienten haben HCMV-seronegative Empfänger von Organen seropositiver Spender (D+R-), also Patienten, die im Rahmen ihrer Organtransplantation eine Erstinfektion durchmachen, sowie seropositive Patienten, die ATG zur Behandlung einer akuten Abstoßung benötigen, mit 50-75 % ein besonders hohes Risiko, eine HCMV-Erkrankung zu entwickeln [4].

Tabelle 1: Klinische Manifestationen der HCMV-Infektion

Direkte und indirekte Effekte der HCMV-Infektion
<p>A. Direkte Effekte der primären HCMV-Infektion oder HCMV-Reaktivierung:</p> <p>Kongenitale HCMV-Infektion: breites Spektrum von klinisch inapparent bis zu schweren Missbildungen</p> <p>Perinatale HCMV-Infektion: selten; interstitielle Pneumonie besonders bei Frühgeborenen</p> <p>HCMV-Mononukleose: v.a. im jungen Erwachsenenalter mononukleoseartige Symptomatik der Erstinfektion</p> <p>HCMV-Infektion bei immunsupprimierten Patienten:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enzephalitis, Meningitis und akute Myelitis transversa - Fieber* - Gastrointestinale Ulzerationen* - Hepatitis* - Myelosuppression mit Leukopenie und Thrombopenie* - Myokarditis* - Nephritis - Pankreatitis - Pneumonie* - Retinitis - Sinusitis - Zystitis <p>B. Indirekte Effekte:</p> <p>Transplantatschaden (akuter/chronischer): z.B. Transplantat-Vaskulopathie*</p> <p>Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD)</p> <p>Globaler immunsuppressiver Effekt, der zu potentiell lebensbedrohlichen opportunistischen Superinfektionen wie z.B. mit <i>Pneumocystis carinii</i> prädisponiert</p>

* häufige Manifestationen bei herz- und/oder lungentransplantierten Patienten, nach [4]

1.1.3. Diagnose

Die vielfältigen diagnostischen und prognostischen Marker der HCMV-Infektion sind detailliert in einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit beschrieben [57]. Hier werden deshalb nur die im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) verwendeten und deshalb für diese Arbeit relevanten Verfahren dargestellt.

Grundlage der (Verdachts-)Diagnose sind Anamnese und klinische Untersuchung. Die Symptomatik einer HCMV-Erkrankung ist jedoch sehr diffus und die Diagnose klinisch deshalb oft schwierig zu stellen: Fieber, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Luftnot, Husten, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Skotome, eine diffuse ZNS-Symptomatik usw. können, je nach Manifestation, auftreten. Paraklinisch wichtige Parameter sind v.a. Leuko- und Thrombozytopenie, Transaminaserhöhung, HCMV-IgG und -IgM, pp65-Antigenämie und HCMV-DNAämie. Wichtige apparative Untersuchungsmethoden sind die Bronchoskopie, Computertomographie, Endoskopie, Echokardiographie, die intramyokardiale Elektrographie (IMEG) [58], Lungenfunktionsdiagnostik und Thorax-Röntgen. Der HCMV-Serostatus wird bei allen Patienten schon vor der Transplantation erhoben. Zur serologischen Diagnostik wird der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) eingesetzt, der die Präsenz HCMV-spezifischer IgG- oder IgM-Antikörper im peripheren Blut nachweist (indirekter Nachweis der Infektion). Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern zeigt eine in der Vergangenheit durchgemachte Primärinfektion an (Ausnahme: passiv übertragene HCMV-IgG). IgM-Antikörper werden sowohl im Rahmen der Primärinfektion als auch nach Reaktivierungen gebildet und erlauben somit keine Unterscheidung beider Entitäten. Zudem ist die Serologie bei immunsupprimierten Patienten auch eher insensitiv. IgG- und IgM-ELISA werden im DHZB in der unmittelbaren post-Transplantationsphase zunächst wöchentlich, dann bei Routineuntersuchungen in der ambulanten Nachsorge bestimmt. Gleiches gilt für die pp65-Antigenämie. Dieser Test beruht als ein direktes Nachweisverfahren auf der Detektion von pp65 in infizierten Leukozyten im peripheren Blut mit Hilfe monoklonaler anti-pp65-Antikörper. Das Ergebnis wird in positiven Zellen pro 200.000 Zellen angegeben. Bei Verdacht auf Reaktivierung oder Erkrankung wird die Antigenämie auch in kleineren Abständen bestimmt. Gelegentlich wird zusätzlich eine qualitative DNA-PCR durchgeführt. Die Diagnose von Organmanifestationen beruht auf dem Nachweis von HCMV in entsprechenden histologischen Präparaten und in der bronchoalveolären Lavage.

1.1.4. Therapie

Die Therapie der HCMV-Infektion beinhaltet die Prophylaxe, die präemptive Therapie und die Behandlung asymptomatischer und symptomatischer Infektionen. Trotz intensiver Bemühungen um eine Standardisierung gehen die Ansichten über die Effektivität verschiedener Protokolle aber nach wie vor weit auseinander. Bei Patienten einer Hochrisikogruppe (HCMV-seronegative Empfänger eines Organs von einem HCMV-positiven Spender, kurz D+R-; ATG bei Abstoßung) sollte der Primärinfektion durch Prophylaxe vorgebeugt werden. Dazu werden Hyperimmunglobulin (HCMV-Ig) und die Nukleosidanaloga Aciclovir, Valaciclovir, Ganciclovir oder neuerdings Valganciclovir eingesetzt. Eine wirkungsvolle HCMV-Impfung ist derzeit noch nicht verfügbar. Unter den vielen Vakzinierungsstrategien gegen HCMV sind die Versuche von Plotkin und Mitarbeitern mit einer abgeschwächten Lebendvakzine („Towne-Stamm“) nennenswert [59]. Der Einsatz einer solchen Lebendvakzine ist im Rahmen einer Organtransplantation aber zu riskant. Ein anderer Ansatz ist die Entwicklung einer sog. Peptidvakzine. Die Kenntnis des HLA-A*0201-restringierten Epitops pp65₄₉₅₋₅₀₃ (**NLVPMVATV**¹) ermöglichte Diamond und Mitarbeitern erste Versuche mit einer solchen Peptidvakzine [60]. Da das Allel HLA-A*0201 weltweit stark verbreitet ist und HCMV-seropositive HLA-A*0201-positive Spender zu einem hohen Prozentsatz gegen dieses Peptid mit CD8+ T-Zell-Antworten reagieren, könnte die Immunisierung mit diesem Peptid HLA-A*0201-positiven Patienten einer Risikogruppe effektiven Schutz vor Primärinfektion verleihen. Mit einem relativ kleinen Repertoire weiterer Peptide, die von anderen häufigen HLA-Allelen präsentiert werden, wäre auf dieser Basis auch die Immunisierung eines noch größeren Bevölkerungsteils denkbar [35].

Die Gabe von Ganciclovir i.v. für 10 bis 14 Tage, gefolgt von einer dreimonatigen oralen Ganciclovir-Gabe, senkt das Risiko einer HCMV-Erkrankung bei Patienten, die ATG zur Behandlung einer akuten Abstoßung benötigen, deutlich [4]. In manchen Zentren gilt eine solche präemptive Ganciclovir-Gabe auch bei Anstieg der Virämie (quantitative PCR) als indiziert [4].

Standard der symptomatischen HCMV-Therapie im DHZB ist nach wie vor Ganciclovir i.v. für 10 bis 14 Tage (5mg/kg Körpergewicht, 2 mal täglich), gefolgt von Ganciclovir per os. Foscarnet wird bei Transplantationspatienten wegen seiner hohen Toxizität nur in Fällen eingesetzt, in denen Ganciclovir nicht zu Besserung führt (Infektion mit Ganciclovir-resistenten HCMV-Stämmen) [61]. Gleiches gilt für das relativ neue Cidofovir, ein ebenfalls recht toxisches Medikament. Im DHZB erhalten alle Patienten nach Transplantation eine prophylaktische Gabe von

¹(wahrscheinliche) immunogene Sequenzen sind in dieser Arbeit einheitlich fett und unterstrichen dargestellt

Aciclovir p.o. gegen Herpesvirusinfektionen im Allgemeinen. Die Aktivität von Aciclovir gegen HCMV ist jedoch schwach, weshalb im Falle positiver pp65-Antigenämien auf Ganciclovir per os umgestellt wird. Bei vermuteter oder gesicherter invasiver HCMV-Erkrankung erhalten die Patienten initial Ganciclovir i.v., später per os. Künftig wird sicher das neue oral gut verfügbare Ganciclovir (Valganciclovir) verstärkt eingesetzt werden.

1.2. Die Rolle von T-Zellen in der Kontrolle von HCMV

Die zentrale Funktion des Immunsystems, und damit auch von T-Lymphozyten, ist die Unterscheidung zwischen gefährlich und ungefährlich. T-Zell-Antworten besitzen die beiden wesentlichen Charakteristika der erworbenen Immunität - Antigenspezifität und Gedächtnis. Alle kernhaltigen Körperzellen präsentieren T-Zellen an MHC-Klasse-I gebundene Peptide auf ihrer Zelloberfläche. Sie geben ihnen damit ein „Inventar“ der in ihrem Zytoplasma enthaltenen, von der Zelle synthetisierten, Proteine. Man nennt das den „endogenen Präsentationsweg“. Auch Peptide, die aus viralen Proteinen in virusinfizierten Zellen oder aus mutierten Proteinen in Tumorzellen stammen, können dem Immunsystem auf diese Weise präsentiert werden. Die sog. zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen sind auf die Elimination solcher Zellen spezialisiert. Durch Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem Peptid, für das sie spezifisch sind und dem dieses Peptid präsentierendem MHC-Klasse-I-Molekül, wird die CD8⁺ T-Zelle aktiviert und der Komplex durch Bindung von CD8 an den TCR stabilisiert. Dieses Signal allein würde jedoch zum Tod der T-Zelle führen („activation induced cell death“, AICD). Um ihre Funktion vermitteln zu können, benötigt die T-Zelle noch ein zweites, kostimulatorisches, Signal („two-signal hypothesis“), wie z.B. die Interaktion von CD28 auf T-Zellen mit den Oberflächenmolekülen CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) auf aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Zytotoxische T-Zellen verfügen über ein breites Repertoire sog. „direkter“ und „indirekter“ Mechanismen, um die als „fremd“ erkannte Zielzelle zu zerstören [62]. Zu den „direkten“ Mechanismen aktivierter CD8⁺ T-Zellen zählen z.B. die Sekretion von Perforin und Granzymen oder die Wechselwirkung von Fas-Ligand (CD95L) mit Fas (CD95) auf der Oberfläche von Zielzellen. Die „indirekten“ Mechanismen, wie die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen wie z.B. TNF- α und IFN- γ , haben keine unmittelbaren zytotoxischen Effekte auf die Zielzelle, sie nehmen Einfluss auf andere Zellen. IFN- γ , das ausserdem noch von CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen produziert wird, ist ein sog. pleiotropes Zytokin, also ein Zytokin mit einer Vielzahl immunmodulatorischer Funktionen. Zu seinen Wirkungen zählt die gesteigerte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf verschiedenen Zelltypen und von MHC-Klasse-II-Molekülen v.a. auf Makrophagen, die Aktivierung von

Endothelzellen, Granulozyten, Makrophagen, T- und NK-Zellen sowie die Differenzierung von T- und B-Zellen. Für IFN- γ wurde auch ein direkter inhibitorischer Effekt auf die Replikation von HCMV beschrieben [39]. Nach Antigenkontakt aktivierte naive CD8⁺ T-Zellen proliferieren und differenzieren z.T. zu Effektor-T-Zellen, deren Aufgabe die Elimination des Antigens ist, für das sie spezifisch sind. Solche Antigen-spezifischen T-Zell-Populationen können dabei massiv expandieren. Bleibt weiterer Antigenkontakt aus, sterben die entstandenen Zellen aber durch Apoptose wieder ab. Ein Teil antigen-geprimter T-Zellen entwickelt sich jedoch zu den funktionell ruhenden sog. Gedächtniszellen weiter. Bei erneutem Antigenkontakt sind diese Zellen in der Lage, innerhalb weniger Stunden eine starke Immunantwort aufzubauen. Die schnelle Produktion von IFN- γ ist ein (zumindest durchflusszytometrisch) sichtbarer Beleg dafür [63].

Das MHC-Klasse-I-Molekül des Menschen besteht aus einer schweren Kette mit drei Domänen (α_1 , α_2 , und α_3) sowie dem β_2 -Mikroglobulin. Die α_1 und α_2 Domänen formen die sog. Antigenbindungsgrube, die zu beiden Seiten geschlossen ist und daher nur relativ kurze Peptide mit einer Länge von 7 bis 13, typischerweise aber von 9, Aminosäuren aufnehmen kann [64]. Variationen der Aminosäuresequenz insbesondere in dieser Region führen zu Unterschieden in der Form der Antigenbindungsgrube zwischen verschiedenen HLA-Allelen. Spezifität und Länge der Peptide, die von den bisher bekannten 83 HLA-A, 186 HLA-B und 46 HLA-C Allelen gebunden werden, hängen ab von den Aminosäureresten, die die Antigenbindungsgrube aufbauen. Durch Vergleich von Peptiden, die von bestimmten HLA-Allelen gebunden waren, konnte gezeigt werden, dass diese Peptide häufig gleiche Aminosäurereste nahe dem N- und C-Terminus hatten. Der Begriff „Bindungsmotiv“, der für dieses Phänomen geprägt wurde, beinhaltet dabei sowohl die Länge als auch die Präferenz für bestimmte Aminosäurereste in bestimmten Positionen eines am betreffenden MHC-Molekül gebundenen Peptids. Finden sich in diesen Positionen Aminosäuren aus einer Gruppe mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften, werden diese Aminosäuren als „Bindungsanker“ bezeichnet. Dabei handelt es sich meistens um den Aminosäurerest in Position 2 sowie den C-terminalen Aminosäurerest. Abbildung 2 (S.14) verdeutlicht das am Beispiel einiger von HLA-A*0201 präsentierter Peptide:

Der häufigste Bindungsanker in Position 2 der Aminosäure-Sequenz ist hier Leucin (L), aber auch andere aliphatische Aminosäuren wie Valin (V), Methionin (M), Isoleucin (I), Alanin (A), und Threonin (T) kommen in dieser Position vor [64]. Als Bindungsanker in Position 9 kommt fast ausschliesslich Valin vor. Andere Aminosäurereste des Peptids ragen aus der Peptidbindungsgrube des MHC-Moleküls heraus, was die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor ermöglicht.

G I L G F V F T L	Influenza-Matrix Protein (59-68)
W L S L L V P F V	Hepatitis B sAg (335-343)
D L M G Y I P L V	Hepatitis C Matrix Protein (17-25)
Y M D G T M S Q V	Tyrosinase (369-377)
I L K E P V H G V	Reverse Transcriptase von HIV (476-484)
N L V P M V A T V	HCMV-Matrix Protein pp65 (489-507)
----- HLA-A*0201 -----	

Abbildung 2 Die Bindungsanker (fett) von HLA-A*0201-präsentierten T-Zell-Epitopen unterschiedlichster Herkunft ähneln sich stark. Das zuunterst gezeigte ist ein auch in dieser Arbeit identifiziertes pp65-Epitop. Modifiziert nach [64]

Die Kenntnis der Bindungsmotive für viele verschiedene HLA-Allele erlaubt mittlerweile die Vorhersage, von welchem HLA-Allel ein gegebenes Peptid sehr wahrscheinlich präsentiert wird. Dieses Prinzip liegt den Datenbanken „SYFPEITHI“ und „BIMAS“ zugrunde.

Im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Molekülen ist die Peptidbindungsgrube von Klasse-II-Molekülen zu beiden Seiten offen und kann daher auch grössere Peptide aufnehmen. Typischerweise haben diese Peptide eine Länge von 15 bis 18 Aminosäuren [64], es kommen jedoch auch viel kürzere (< 9) und längere (> 24) Liganden in Frage. Die Präferenz für bestimmte Aminosäurereste in Bindungspositionen ist bei MHC-Klasse-II-Molekülen zudem viel weniger stringent als bei Klasse-I-Molekülen: Aminosäuren, die zu biochemisch sehr unterschiedlichen Gruppen zählen, werden gleichermassen toleriert, was die Definition von Bindungsmotiven stark erschwert. MHC-Klasse-II-Moleküle befinden sich nur auf der Oberfläche von Zellen, die auf die Präsentation von Antigen spezialisiert sind (APC), wie Makrophagen, Langerhans- und dendritische Zellen, aber auch B-Zellen. APC nehmen Antigene durch Endophagozytose aus ihrer Umgebung auf und präsentieren diese den CD4⁺ T-Helfer-Zellen (sog. „exogener Präsentationsweg“). T-Helferzellen sind zentrale „Organisatoren“ der Immunantwort. Durch das Zytokinrepertoire, das sie ausschütten, bestimmen sie die Art der resultierenden Immunantwort.

1.3. Aufgaben und (mögliche) Anwendungen der durchflusszytometrischen T-Zell-Epitop-Kartierung

Die Aufgaben und (möglichen) Anwendungen der durchflusszytometrischen T-Zell-Epitop-Kartierung erstrecken sich auf alle im Abschnitt 1.1 dargestellten Gebiete. Im Vordergrund steht dabei die Erforschung der komplexen Natur der T-Zell-Antwort gegen HCMV und die damit verbundenen pathogenetischen Implikationen. Davon verspricht man sich entscheidenden Einfluss auf die Diagnostik. Vor allem die Entwicklung eines intensivierten Immunmonitorings mit

dem Ziel, das Risiko einer HCMV-Erkrankung besser und früher abschätzen zu können, ist damit verbunden. Zudem kann der Einfluss der immunsuppressiven Therapie auf die HCMV-spezifischen T-Zellen direkt untersucht werden. Wie erwähnt, sind bereits Versuche des Immunmonitorings auf Epitop-Ebene bei KMT-Patienten mit Hilfe von sog. „Tetrameren“ durchgeführt worden [46, 47]. Dabei handelt es sich um tetramere, über Streptavidin gekoppelte und mit Peptiden beladene MHC-Molekül-Komplexe, die mit Phycoerythrin (PE) markiert sind und so die direkte Darstellung Peptid-spezifischer T-Zellen gestatten. Die Entwicklung von „Tetrameren“ ist aber ohne Kenntnis der immunogenen Peptide und der präsentierenden HLA-Allele nicht möglich. Auch dies ist ein wichtiger Ertrag der T-Zell-Epitop-Kartierung. Darüber hinaus hat die Kenntnis von Epitopen eine entscheidende Bedeutung sowohl für die Entwicklung einer effektiveren Prophylaxe, beispielsweise in Form verbesserter Peptid-Vakzinen, als auch für die Therapie mit Hilfe des adoptiven Transfers HCMV-spezifischer T-Zellen. Vor allem aber könnte die medikamentöse Therapie für Patienten, die in einer bestimmten Phase des klinischen Verlaufes oder auf dem Boden ihrer T-Zell-Antwort ein erhöhtes Risiko für eine HCMV-Erkrankung haben, durch gezielteren Einsatz entscheidend optimiert werden; Patienten, die keiner Prophylaxe oder Therapie bedürfen, blieben unerwünschte Nebenwirkungen dieser Maßnahmen erspart.

2. Problemstellung

Schon seit langem ist die zentrale Rolle der T-Zellen bei der Kontrolle der HCMV-Infektion bekannt. Welche aber die entscheidenden Kriterien dafür sind, dass diese T-Zell-Antwort effektiven Schutz vor einer HCMV-Erkrankung zu bieten vermag, ist bisher nur unzureichend geklärt. Hängt die Effektivität des Schutzes allein von der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen ab? Wenn nicht, welche Rolle spielt die „Struktur“ der T-Zell-Antwort, d.h. welche und wie viele verschiedene Zielstrukturen von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen im HCMV erkannt werden? Gibt es auf dieser Basis möglicherweise einen HLA-Typ, der zur Entwicklung einer HCMV-Erkrankung prädisponiert, während ein anderer eher protektiv ist? Welchen Stellenwert haben CD4+, CD8+ T-Zellen und das Zusammenspiel beider Subpopulationen bei der Kontrolle der Infektion? Ein umfassenderes Verständnis der Mechanismen, die vor Reaktivierung schützen, könnte das Management von HCMV bei immunsupprimierten Patienten entscheidend verbessern: sensiblere Diagnostik und gezielterer Einsatz von Prophylaxe, präemptiver Therapie und Therapie symptomatischer Infektionen könnten zum verbessertem Schutz von Patienten mit erhöhtem Risiko führen. Den Patienten dagegen, die relativ sicher vor der Entwicklung einer HCMV-Erkrankung sind, könnten unnötige Risiken und Nebenwirkungen dieser Massnahmen erspart bleiben (beispielsweise die myelotoxische Wirkung von Ganciclovir, die z.T. zu schwerer Neutropenie bis hin zur Agranulozytose führen kann). Arbeiten, die sich mit solchen Fragen auseinandersetzen, verwenden dazu häufig Material gesunder Probanden. Die Untersuchung von Patienten mit einem hohen Risiko für HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung bietet jedoch bedeutend mehr Möglichkeiten, die pathogenetischen Implikationen der gemachten Beobachtungen zu interpretieren.

In dieser Arbeit wurden deshalb drei Ziele verfolgt:

- (1) Zunächst sollte, v.a. auch im Hinblick auf zukünftige Projekte, ein Verfahren entwickelt werden, welches gestattete, die CD4+ und CD8+ T-Zell-Reaktionen gegen immundominante Proteine mit einem Minimum an Material vollständig in die jeweiligen antigenen Determinanten aufzuschlüsseln und bis hinab auf die Ebene einzelner Klone zu analysieren.
- (2) Diese Techniken wurden dann bei einer Gruppe herz- und lungentransplantierten Patienten eingesetzt, um die T-Zell-Antwort gegen die beiden wahrscheinlich wichtigsten Ziele in HCMV, IE-1 und pp65, im Detail zu studieren und mehr über die Komplexität und die Gesetzmässigkeiten dieser Antwort zu lernen.

- (3) Schliesslich wurden die beobachteten Unterschiede in der Struktur der T-Zell-Antwort zwischen den Patienten mit deren unterschiedlichen klinischen Verläufen im Hinblick auf HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung in Beziehung gesetzt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Patienten- und Probandenmaterial

In einem vorangegangenen Projekt wurden die T-Zell-Antworten auf IE-1 und pp65 von 43 herz- und lungentransplantierten Patienten von einem anderen Untersucher über 6 Monate nach Transplantation verfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle HCMV-IgG-seropositiven Patienten (kurz: Patienten; Pt-2, Pt-7, Pt-9¹ usw.) aus dieser Gruppe untersucht, die messbare T-Zell-Reaktionen auf eines oder beide Proteine hatten. Die wichtigsten Charakteristika dieser insgesamt 17 herz- und 3 lungentransplantierten Patienten, die alle bereits vor Transplantation HCMV-IgG-seropositiv waren, sind in Tabelle 3 (S.19) zusammengefasst. Die Verteilung der HLA-Allele in der Patientengruppe zeigt Abbildung 3 (S.20). Mit der Epitop-Kartierung wurde zwischen dem 150. und 450. Tag nach Transplantation begonnen. Dazu wurde den Patienten zu Routineuntersuchungszeitpunkten in der Transplantationsambulanz oder während stationärer Klinikaufenthalte im DHZB 16.2 ml venöses Blut (sechs 2.7 ml Cirtat-Monovetten) abgenommen. Aus diesem Blut wurden am gleichen Tag PBMC präpariert.

Zur Untersuchung der HCMV-IgG-seropositiven gesunden Probanden (kurz: gesunde Probanden; Pr-1, Pr-2, usw.) wurde für methodische Untersuchungen venöses Vollblut in verschiedenen Serien und unter Verwendung von Citrat oder Heparin abgenommen.

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

2.7 und 10 ml Citrat-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5.5 ml Lithium-Heparin-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10 ml Monovetten mit 150 I.E. Liquemin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0.5, 1.5 und 2.0 ml Eppendorfgläser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2052-Falcon-Röhrchen (5 ml; Polypropylen)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
14 ml „Cellstar“-Polypropylen-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
14 ml Polyethylen-Röhrchen mit Deckel	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
2070-Falcon-Röhrchen (50 ml; Polypropylen)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen zu 10, 100 und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
sterile Transferpipetten (3.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
sterile Pipettenspitzen (5 und 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
LS Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

¹ Um Verwirrungen in der Gesamtdokumentation des Labors zu vermeiden, wurde die ursprüngliche Numerierung der Patienten aus der Vorstudie beibehalten; die Numerierung der Patienten in dieser Arbeit ist daher nicht kontinuierlich.

Tabelle 2: Charakteristika der Stichprobe von 20 transplantierten Patienten

Parameter	Wert
Alter bei Transplantation in Lebensjahren: Median (Spannweite)	50 (31-66)
Geschlecht: w/m	5/15
Diagnose:	
Dilatative Kardiomyopathie (dKMP)	12 (60 %)
Restriktive Kardiomyopathie (rKMP)	1 (5 %)
Koronare Herzerkrankung (KHK)	3 (15 %)
Herzinsuffizienz bei hochgradiger Aorten- und Mitralinsuffizienz	1 (5 %)
Lungenemphysem bei α -1-Antitrypsinmangel	2 (10 %)
Primäre Pulmonale Hypertonie (PPH)	1 (5 %)
Transplantiertes Organ: Herz/Doppel-Lunge	17/3
Spender-/Empfänger-HCMV-Serostatus:	
D-R+	11 (55 %)
D+R+	9 (45 %)
Immunsuppressive Therapie (Beginn/Ende des Beobachtungszeitraums):	
Cyclosporin A	20/20
Prednisolon	20/20
Azathioprin	14/8
Mycophenolat Mofetil	6/10
Rapamycin	1/1
Abstoßungen: Nein/Ja	6/14
HCMV-Reaktivierung:	
1 = HCMV-seropositiv, keine DNA-/Antigenämie	6 (30 %)
2 = DNA-/Antigenämie, keine klinischen Symptome	7 (35 %)
3 = DNA-/Antigenämie, Fieber und/oder Leukopenie	2 (10 %)
4 = DNA-/Antigenämie, invasive HCMV-Erkrankung	5 (25 %)
Anzahl der dokumentierten Reaktivierungen je Patient im Beobachtungszeitraum: Median (Spannweite)	1 (0-5)
Frühe (≤ 90 Tage) und späte (> 90 Tage) HCMV-Reaktivierungen (4 Patienten hat sowohl frühe wie späte Reaktivierungen)	18/6
Antigenämie: Median (Spannweite): positive/200.000 Zellen	3 (0-39)

* 4 Patienten hatten sowohl frühe als auch späte Reaktivierungen

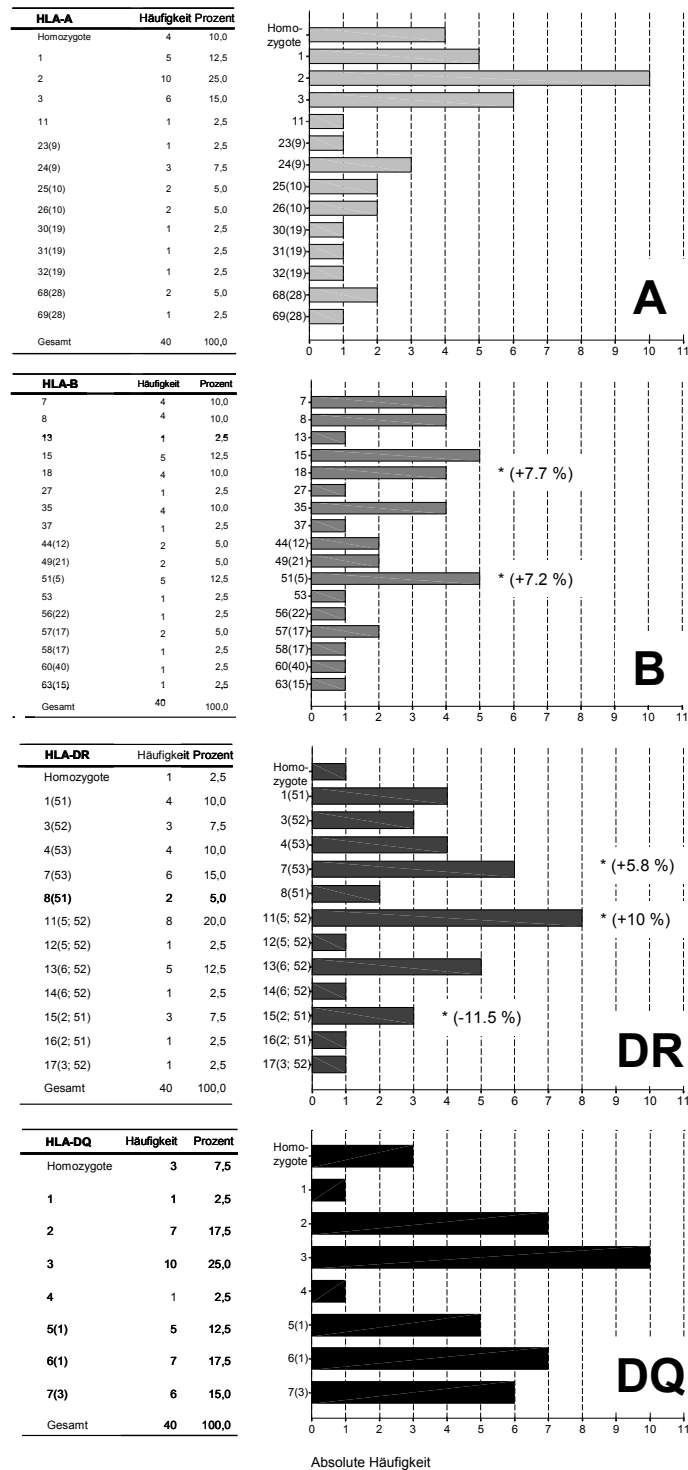


Abbildung 3 Die Verteilung der HLA-Allele in der Patientengruppe entsprach im Wesentlichen der in der Gesamtbevölkerung. In der rechten Spalte sind die absoluten Häufigkeiten der HLA-A, -B, -DR und -DQ-Allele in der Patientengruppe dargestellt, die Tabellen in der linken Spalten geben zusätzlich die relativen Häufigkeiten an. Abweichungen von > 5 % in der relativen Häufigkeit eines HLA-Allels zu einer (repräsentativen) Stichprobe von 174 Spendern [S. Ferencik, H. Gross-Wilde, Essen] sind mit * [Differenz des Prozentwertes] angegeben. Beispiel: 4 Patienten hatten das Allel HLA-B18 (entsprechend 10 % der insgesamt 40 HLA-B-Allele in der Patientengruppe). In der repräsentativen Stichprobe kam HLA-B18 in 2.30 % vor; das entspricht einer Differenz von 7.7 % zur Patientengruppe. Bw4 und Bw6 waren insgesamt jeweils 16 mal vorhanden, Cw-Allele wurden nur bei 4 Patienten typisiert (hier nicht dargestellt).

3.1.3. Chemikalien, Medium, Lösungen, Puffer

Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Sigma, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Pierce, Rockford, USA
Ethyldiamin tetra-Essigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natrium Azid (NaN_3)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat (Tween 20)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
FACS-Lyse-Reagenz	BD, San Jose, USA
Ficoll-Paque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Na-Heparin (Liquemin [®])	Roche, Eppstein, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Humane Immunglobulin-Lösung (Octagam [®])	Octapharma, Langenfeld, Deutschland
Sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Dulbeccos, Gibco, Grossbritannien
Unsterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Hausapotheke der Charité
1640 RPMI-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland

- Zellkulturmedium: 1640 RPMI-Medium + 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 I.E. Penicillin/Streptomycin
- Permeabilisierungslösung: 400 ml Aqua dest., 100 ml FACS-Lyse-Reagenz, 250 µl Tween 20
- EDTA-Lösung: PBS + 2 mM EDTA
- PFA-Fixationslösung: PBS + 1 % (w/v) PFA
- Wasch-Puffer: PBS + 0.5 % (w/v) BSA, 0.1 % (w/v) NaN_3
- MACS-Puffer: PBS + 0.5 % (w/v) BSA, 2 mM EDTA

3.1.4. Monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper und -Antikörperkonjugate

Tabelle 3: Verwendete Antikörper und -Antikörperkonjugate

Antikörper	Hersteller	Antikörper	Hersteller
anti-CD28	BD, San Jose, USA	anti-V β 7-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD49d	BD, San Jose, USA	anti-V β 8.1/8.2-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD3-PerCP	BD, San Jose, USA	anti-V β 9-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD4-PE	BD, San Jose, USA	anti-V β 11-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD8-PerCP	BD, San Jose, USA	anti-V β 12-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD8-APC	BD, San Jose, USA	anti-V β 13.1-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD14-PerCP	BD, San Jose, USA	anti-V β 13.6-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD69-FITC	BD, San Jose, USA	anti-V β 14-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD69-PE	BD, San Jose, USA	anti-V β 17-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-IFN- γ -FITC	BD, San Jose, USA	anti-V β 18-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-IFN- γ -APC	IQ Products, Groningen, Niederlande	anti-V β 20-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-V β 1-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-V β 21.3-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-V β 2-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-V β 22-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-V β 3-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-V β 23-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-V β 5.1-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-Pan α/β -PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-V β 5.2-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-CD45-anti-IFN- γ (Catch Reagent)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
anti-V β 5.3-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich	anti-IFN- γ -PE (Detection Antibody)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
anti-V β 6.7-FITC	Serotech, Düsseldorf, Deutschland	anti-PE-Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

3.1.5. Antigene: Einzelpeptide, Peptidpools, virales Lysat

Die verwendeten Peptide von 9, 10 und 15 Aminosäuren Länge wurden in der Abteilung für Peptid- und Proteinchemie des Instituts für Medizinische Immunologie der Charité und der Firma NMI (Reutlingen) nach Standard-Fmoc-Verfahren [65] synthetisiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Sequenzen der Peptide sind den Tabellen 5 (S.24) und 6 (S.25) zu entnehmen. Je-

des Peptid wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 80 mg/ml gelöst (Stammlösung). Aus diesen Stammlösungen wurden je nach Bedarf Arbeitslösungen durch Verdünnung mit DMSO hergestellt. Für methodische Arbeiten benötigte Einzelpeptide wurden direkt vor der Zugabe mit PBS auf die benötigten Konzentrationen eingestellt. Zur Herstellung der Peptidpools wurden die Einzelpeptide bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre mit DMSO auf eine Konzentration von 0.25 mg/ml gebracht, wie benötigt zusammenpipettiert, und in Aliquots von 4 µl eingefroren. Zwei Peptidpools (die „Gesamtmischungen“) enthielten jeweils alle Pentadecapeptide des entsprechenden Proteins. Die Konzentration der Peptide in diesen Pools betrug ebenfalls 1 µg/ml. Auch diese Pools wurden in Aliquots zu 4 µl eingefroren. Einzelpeptide zur Nachtestung wurden mit DMSO auf 1 mg/ml, gereinigtes und zuvor im Ultraschallbad homogenisiertes HCMV-Lysat (ABI, Columbia, USA) mit PBS auf eine Konzentration von 0.25 mg/ml gebracht. Alle Antigene wurden bei -70° C aufbewahrt.

3.2. Verwendete Geräte und Software

3.2.1. *Verwendete Geräte*

Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Brutschrank EG 110 R	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
FACSCalibur-Durchflussszytometer	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACSVantage-Durchflussszytometer	Becton Dickinson, San Jose, USA
FACSDiva-Durchflussszytometer	Becton Dickinson, San Jose, USA
Laminar-Flow-Box	Kendro, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
MidiMACS-Separationsstände und -magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe Pipettus standard	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Wasserbad	Grant, Cambridge, Grossbritannien
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge CR422	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich

3.2.2. *Verwendete Software*

Cell Quest ^{Pro}	Becton Dickinson, San Jose, USA
Paint-A-Gate ^{Pro}	Becton Dickinson, San Jose, USA
Word 97/2000	Microsoft Corp., Redmont, USA
Excel 7.0	Microsoft Corp., Redmont, USA
Power Point	Microsoft Corp., Redmont, USA
FreeHand 9	Macromedia, San Francisco, USA
SPSS für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA

Tabelle 4: Aminosäure-Sequenzen der verwendeten IE-1-Pentadecapeptide

Peptid	Aminosäure-Sequenz	Peptid	Aminosäure-Sequenz	Peptid	Aminosäure-Sequenz
1	MESSAKRKMDPDNPD	41	EDKREMWMACIKELH	81	SVMLAKRPLITKPEV
2	AKRKMDPDNPDEGPS	42	EMWMACIKELHDVSK	82	AKRPLITKPEVISVM
3	MDPDNPDEGPSSKVP	43	ACIKELHDVSKGAAN	83	LITKPEVISVMKRRI
4	NPDEGPSSKVPRPET	44	ELHDVSKGAANKLGG	84	PEVISVMKRRIEEIC
5	GPSSKVPRPETPVTK	45	VSKGAANKLGGALQA	85	SVMKRRIEEICMKVF
6	KVPRPETPVTKATTF	46	AANKLGGALQAKARA	86	RIEEICMKVFAQYI
7	PETPVTKATTFQLQTM	47	LGGALQAKARAKKDE	87	EICMKVFAQYILGAD
8	VTKATTFQLQTMLRKE	48	LQAKARAKKDELRRK	88	KVFAQYILGADPLRV
9	TTFLQTMLRKEVNSQ	49	ARAKKDELRRKMMYM	89	QYILGADPLRVCS
10	QTMLRKEVNSQLSLG	50	KDELRRKMMYMCYRN	90	GADPLRVCSPSVDDL
11	RKEVNSQLSLGDPLF	51	RRKMMYMCYRNIEFF	91	LRVCSPSVDDLRAIA
12	NSQLSLGDPLFPELA	52	MYMCYRNIEFFTKNS	92	SPSVDDLRAIAEESD
13	SLGDPLFPELAEESL	53	YRNIEFFTKNSAFPK	93	DDLRAIAEESDEEEA
14	PLFPELAEESLKTFE	54	EFFTKNSAFPKTTNG	94	AIAEESDEEEAIVAY
15	ELAEESLKTFEQVTE	55	KNSAFPKTTNGCSQA	95	ESDEEEAIVAYTLAT
16	ESLKTFEQVTEDCNE	56	FPKTTNGCSQAMAAL	96	EEAIVAYTLATAGVS
17	TFEQVTEDCNENPEK	57	TNGCSQAMAALQNL	97	VAYTLATAGVSSSDS
18	VTEDCNENPEKDVLA	58	SQAMAALQNLQPCSP	98	LATAGVSSSDSLVSP
19	CNENPEKDVLAELVK	59	AALQNLQPCSPDEIM	99	GVSSSDSLVSPPEP
20	PEKDVLAELVKQIKV	60	NLPQPCSPDEIMAYA	100	SDSLVSPPEPVPAT
21	VLAELVKQIKVRVDM	61	CSPDEIMAYAQKIFK	101	VSPPEPVPATIPLS
22	LVKQIKVRVDMVRHR	62	EIMAYAQKIFKILDE	102	ESPVPATIPLSVIV
23	IKVRVDMVRHRIKEH	63	YAQKIFKILDEERDK	103	PATIPLSVIVAENS
24	VDMVRHRIKEHMLKK	64	IFKILDEERDKVLTH	104	PLSSVIVAENSQEE
25	RHRIKEHMLKKYTQT	65	LDEERDKVLTHIDHI	105	VIVAENSQEESEQS
26	KEHMLKKYTQTEEFK	66	RDKVLTHIDHIFMDI	106	ENSQEESEQSDEEE
27	LKKYTQTEEFKFTGAF	67	LTHIDHIFMDILTTC	107	QEESEQSDEEEEGA
28	TQTEEFKFTGAFNMMG	68	DHIFMDILTTCVETM	108	EQSDEEEEGAQEER
29	EKFTGAFNMMGGCLQ	69	MDILTTCVETMCNEY	109	EEEEEGAQEEREDTV
30	GAFNMMGGCLQNALD	70	TTCVETMCNEYKVTS	110	EGAQEEREDTVSVKS
31	MMGGCLQNALDILDK	71	ETMCNEYKVTSDACM	111	EEREDTVSVKSEPV
32	CLQNALDILDKVHEP	72	NEYKVTSDACMMTMY	112	DTVSVKSEPVSEIEE
33	ALDILDKVHEPFEEEM	73	VTSDACMMTMYGGIS	113	VKSEPVSEIEEVAPE
34	LDKVHEPFEEEMKCIG	74	ACMMTMYGGISLLSE	114	PVSEIEEVAPEEEED
35	HEPFEEEMKCIGLTMQ	75	TMYGGISLLSEFCRV	115	IEEVAPEEEEDGAEE
36	EEMKCIGLTMQSMYE	76	GISLLSEFCRVLCY	116	APEEEEEDGAEEPTAS
37	CIGLTMQSMYENYIV	77	LSEFCRVLCYVLEE	117	EEDGAEEPTASGGKS
38	TMQSMYENYIVPEDK	78	CRVLCYVLEETSVM	118	AEEPTASGGKSTHPM
39	MYENYIVPEDKREMW	79	CCYVLEETSVM LAKR	119	TASGGKSTHPMVTRS
40	YIVPEDKREMW MACI	80	LEETSVM LAKRPLIT	120	GKSTHPMVTRSKADQ

Tabelle 5: Aminosäure-Sequenzen der verwendeten pp65-Pentadecapeptide

Peptid	Aminosäure-Sequenz	Peptid	Aminosäure-Sequenz	Peptid	Aminosäure-Sequenz
1	MESRGRRCPemisVL	47	AFVFPTKDVALRHVV	93	FTSQYRIQGKLEYRH
2	GRRCPemisVLGPIS	48	PTKDVALRHVVCAHE	94	YRIQGKLEYRHTWDR
3	PEmisVLGPISGHVL	49	VALRHVVCAHELVCS	95	GKLEYRHTWDRHDEG
4	SVLGPISGHVLKAVF	50	HVVCAHELVCSMENT	96	YRHTWDRHDEGAAQG
5	PISGHVLKAVFSRGD	51	AHELVCSMENTRATK	97	WDRHDEGAAQGDDDV
6	HVLKAVFSRGDTPVL	52	VCSMENTRATKMQVI	98	DEGAAQGDDDVWTSG
7	AVFSRGDTPVLPKET	53	ENTRATKMQVIGDQY	99	AQGDDDVWTSGSDSD
8	RGDTPVLPKETRLQ	54	ATKMQVIGDQYVKVY	100	DDVWTSGSDSDEELV
9	PVLPKETRLQTGIH	55	QVIGDQYVKVYLESF	101	TSGSDSDEELVTTER
10	HETRLQTGIHVRVS	56	DQYVKVYLESFCEDV	102	DSDEELVTTERKTPR
11	LLQTGIHVRVSQPSL	57	KVYLESFCEDVPSGK	103	ELVTTERKTPRVTGG
12	GIHVRVSQPSLILVS	58	ESFCEDVPSGKLFMH	104	TERKTPRVTGGGAMA
13	RVSQPSLILVSQYTP	59	EDVPSGKLFMHVTLG	105	TPRVTGGGAMAGAST
14	PSLILVSQYTPDSTP	60	SGKLFMHVTLGSDVE	106	TGGGAMAGASTSAGR
15	LVSQYTPDSTPCHRG	61	FMHVTLGSDVEEDLT	107	AMAGASTSAGRKRKS
16	YTPDSTPCHRGDNQL	62	TLGSDVEEDLTMTRN	108	ASTSAGRKRKSASSA
17	STPCHRGDNQLQVQH	63	DVEEDLTMTRNQPPF	109	AGRKRKSASSATACT
18	HRGDNQLQVQHTYFT	64	DLTMTRNQPPFMRPH	110	RKSASSATACTSGVM
19	NQLQVQHTYFTGSEV	65	TRNPQPPFMRPHERNG	111	SSATACTSGVMTRGR
20	VQHTYFTGSEVENVS	66	QPPFMRPHERNGFTVL	112	ACTSGVMTRGRLKAE
21	YFTGSEVENVSVNVH	67	RPHERNGFTVLCPKN	113	GVMTRGRLKAESTVA
22	SEVENVSVNVHNPTG	68	RNGFTVLCPKNMIIK	114	RGRLKAESTVAPEED
23	NVSVNVHNPTGRSIC	69	TVLCPKNMIIKPGKI	115	KAESTVAPEEDTDED
24	NVHNPTGRSICPSQE	70	PKNMIIKPGKISHIM	116	TVAPEEDTDEDSNE
25	PTGRSICPSQEPMSI	71	IIKPGKISHIMLDVA	117	EEDTDEDSNEIHNP
26	SICPSQEPMSIYVYA	72	GKISHIMLDVAFTSH	118	DEDSNEIHNPVFT
27	SQEPMSIYVYALPLK	73	HIMLDVAFTSHEHFG	119	DNEIHNPVFTWPPW
28	MSIYVYALPLKMLNI	74	DVAFTSHEHFGLLCP	120	HNPVFTWPPWQAGI
29	VYALPLKMLNIPSIN	75	TSHEHFGLLCPKSIP	121	VFTWPPWQAGILARN
30	PLKMLNIPSINVHHY	76	HFGLLCPKSIPGLSI	122	PPWQAGILARNLVPM
31	LNIPSINVHHYPSAA	77	LCPKSIPGLSISGNL	123	AGILARNLVPMVATV
32	SINVHHYPSAAERKH	78	SIPGLSISGNLLMNG	124	ARNLVPMVATVQGQN
33	HHYPSAAERKHRHLP	79	LSISGNLLMNGQQIF	125	VPMVATVQGQNLKYQ
34	SAAERKHRHLPVADA	80	GNLLMNGQQIFLEVQ	126	ATVQGQNLKYQEFFW
35	RKHRHLPVADAVIHA	81	MNGQQIFLEVQAIRE	127	GQNLKYQEFFWDAND
36	HLPVADAVIHASGKQ	82	QIFLEVQAIRETVEL	128	KYQEFFWDANDIYRI
37	ADAVIHASGKQMWQA	83	EVQAIRETVELRQYD	129	FFWDANDIYRIFAEL
38	IHASGKQMWQARLTV	84	IRETVELRQYDPVAA	130	ANDIYRIFAELGVW
39	GKQMWQARLTVSGLA	85	VELRQYDPVAALFFF	131	YRIFAELGVWQPAA
40	WQARLTVSGLAWTRQ	86	QYDPVAALFFFDIDL	132	AELEGVWQPAAQPKR
41	LTVSGLAWTRQONQW	87	VAALFFFDIDLQLR	133	GVWQPAAQPKRRRHR
42	GLAWTRQONQWKEPD	88	FFFDIDLQLRGPQY	134	PAAQPKRRRHRQDAL
43	TRQONQWKEPDVYYT	89	IDLLLQRPQYSEHP	135	PKRRRHRQDALPGPC
44	NQWKEPDVYYTSAFV	90	LQRPQYSEHPTFTS	136	RHRQDALPGPCIAST
45	EPDVYYTSAFVFPTK	91	PQYSEHPTFTSQYRI	137	DALPGPCIASTPKKH
46	YYTSAFVFPTKDVAL	92	EHPTFTSQYRIQGKL	138	GPCIASTPKKHRG

3.3. Methoden

3.3.1. Zellpräparation

PBMC wurden aus Vollblut durch Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll-Paque (Dichte: 1.078 g/ml bei 20°C) isoliert. Die Präparation folgte bei allen Versuchen i.W. dem gleichen Protokoll (auf Unterschiede ist hingewiesen):

- 14 ml Polyethylen-Röhrchen wurden mit 3 ml Ficoll beschickt, welches vorsichtig mit 8 ml von mindestens 1:2 mit sterilem PBS verdünntem Vollblut überschichtet wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1000 g für 20 min.
- Die zwischen Plasma und Ficoll befindliche Zellschicht (PBMC) wurde vorsichtig abgehoben und dreimal mit sterilem PBS gewaschen (1. Waschschrift 210 g/10 min., 2. Waschschrift 174 g/10 min., 3. Waschschrift 164 g/12 min.).
- Die Zellen wurden anschließend in einem 50 ml-Polypropylen-Röhrchen mit Zellkulturmedium auf eine Zellkonzentration von 2.0×10^6 Zellen/ml eingestellt und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre vorinkubiert. Bei der Präparation von PBMC aus Patientenmaterial wurde auf den 2. Waschschrift verzichtet, um den Zellverlust zu reduzieren. Ausserdem wurde die Zellkonzentration bei Bedarf bis auf ein Minimum von 1.0×10^6 Zellen/ml eingestellt, um das vorhandene Material optimal auszunutzen.

3.3.2. Antigen-Stimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung unter Verwendung von Vollblut

- Venöses Vollblut von Probanden wurde in verschiedenen Monovetten (Citrat-, Lithium- und Natrium-Heparin-Monovetten) abgenommen.
- Alle Ansätze wurden als Dreifachansatz durchgeführt. Jeweils 1 ml Vollblut wurde dazu in 14 ml-„Cellstar“-Polypropylen-Röhrchen pipettiert, diese mit dem zugehörigen Deckel verschlossen und die Proben bei Raumtemperatur während der Präparation von PBMC (ca. 120 min.) stehend gelagert.
- Peptide und virales Lysat wurden anschließend zeitgleich mit der Stimulation von PBMC in Volumina von 1, 10, 20 und 40 µl (Arbeitskonzentrationen von 0.1 und 1 mg/ml) zugegeben. Die Endkonzentration der Antigene betrug je nach Versuchsansatz für Peptide 0.1, 1, 10 und 40 µg/ml (exakt: 0.1, 1.0, 9.90 und 38.46 µg/ml) und für virales Lysat 0.1, 1, 10 und 20 µg/ml (exakt: 0.1, 1.0, 9.90 und 19.60 µg/ml). Als Negativkontrolle diente ein Dreifachansatz, dem je 4 µl DMSO zugegeben wurden. Durch Verwendung von PBS als Lösungsmittel

für die Antigene wurde die DMSO-Konzentration in allen Proben unter 0.1 % (vol/vol) gehalten.

- Die Proben wurden anschließend in 5° Schräglage von der Horizontalen bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert, bevor nach 2 Stunden 2 µl einer in DMSO gelösten Stammlösung von 5 mg/ml des Sekretionshemmers Brefeldin A (BFA) zugegeben wurden. Die Endkonzentration von BFA betrug somit 10 µg/ml in allen Proben.
- Nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion durch Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS gestoppt. Die Ansätze wurden dann für 8 min. bei 430 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet gründlich resuspendiert.
- Anschließend wurden 10 ml FACS-Lyse-Lösung für 10 min. bei Raumtemperatur zugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren.
- Nachdem die Zellen herunterzentrifugiert, durch Zugabe von 4 ml Waschpuffer (bei 430 g und 4°C für 8 min.) gewaschen, dekantiert und resuspendiert wurden, erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen. Dazu wurde 1 ml Permeabilisierungs-Lösung zugegeben und die Proben für 10 min. bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.
- Nach einem weiteren Waschschrift erfolgten die intrazelluläre Färbung und die Oberflächenfärbung mit sättigenden Mengen monoklonaler Antikörperkonjugate (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-APC und anti-IFN-γ-FITC) für 30 min. bei Dunkelheit auf schmelzendem Eis. Auf Isotyp-Kontrollen wurde verzichtet, da diese sich in vorangegangenen Versuchen nicht als nützlich erwiesen hatten (siehe Abschnitt 4.1). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen durch 5-minütige Zugabe von 1 % PFA-Lösung refixiert, nochmals gewaschen und am folgenden Tag gemessen.

3.3.3. *Antigen-Stimulation und intrazelluläre Zytokinfärbung unter Verwendung von PBMC*

- Für den Vergleich von Vollblut und PBMC sowie verschiedener Antikoagulanzen wurde HCMV-seropositiven gesunden Spendern venöses Vollblut in verschiedenen Monovetten (Citrat-, Lithium- und Natrium-Heparin) abgenommen; daraus wurden, wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben, PBMC isoliert. Alle Proben wurden als Dreifachansatz durchgeführt. Peptide und virales Lysat wurden zeitgleich mit der Stimulation von Vollblut in Volumina von 1, 10, 20 und 40 µl (Arbeitslösungen 0.1 und 1 mg/ml) zugegeben. Die Endkonzentrationen der Stimulantien betrug je nach Versuchsansatz für Peptide 0.1, 1, 10 und 40 µg/ml (exakt: 0.1, 1.0, 9.90 und 38.46 µg/ml) und für virales Lysat 0.1, 1, 10 und 20 µg/ml (exakt: 0.1, 1.0, 9.90 und 19.60 µg/ml). Als Negativkontrolle diente ein Dreifachansatz, dem je 4 µl DMSO

zugegeben wurden. Durch Verwendung von PBS als Lösungsmittel lag die DMSO-Konzentration in allen Proben unter 0.1 % (vol/vol).

- PBMC von Patienten wurden zunächst präpariert (vgl. Abschnitt 3.3.1), mit Zellkulturmedium auf eine Zell-Konzentration von 1.0 bis 2.0×10^6 Zellen/ml eingestellt und über Nacht im Brutschrank vorinkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden Einzelansätzen jeweils $4 \mu\text{l}$ der vorbereiteten Pools oder Einzelpeptide bzw. DMSO für die Negativkontrolle zugegeben.
- Für die Stimulation von PBMC wurden zunächst 100 ml Kulturmedium in 2052-Falcon-Röhrchen pipettiert, das jeweilige Stimulanz darin aufgenommen und anschließend $400 \mu\text{l}$ der Zellsuspension zugegeben.
- Die Proben wurden darauf in 5° Schräglage von der Horizontalen bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre im Brutschrank inkubiert.
- Nach 2 Stunden wurden pro Ansatz $2 \mu\text{l}$ BFA (der o.g. Stammlösung) in $500 \mu\text{l}$ warmen Kulturmedium aufgenommen und den Proben vorsichtig zugegeben. Die Endkonzentration von BFA betrug so in allen Proben $10 \mu\text{g/ml}$.
- Nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion durch Zugabe von 3 ml eiskaltem PBS abgestoppt, die Proben für 8 min. bei 430 g und 4°C herunterzentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert.
- Danach wurden 3 ml einer 2 mM EDTA-Lösung zugegeben und die Proben für 10 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. (EDTA entzieht den Zellen Ca^{2+} . Sie sollen dadurch die Fähigkeit zur Adhäsion an der Röhrchenwand verlieren).
- Nachdem die Ansätze herunterzentrifugiert, gründlich resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml Waschpuffer (bei 430 g und 4°C für 8 min.) gewaschen wurden, erfolgte die Permeabilisierung, Antikörperfärbung, und Fixierung wie für Vollblut beschrieben.
- Für die Identifizierung der für die IFN- γ -Produktion verantwortlichen Peptide wurde für Vollblut- und PBMC-Proben eine Kombination von $10 \mu\text{l}$ anti-CD3-PerCP, $10 \mu\text{l}$ anti-CD4-PE, $0.5 \mu\text{l}$ anti-CD8-APC und $10 \mu\text{l}$ anti-IFN- γ -FITC pro Ansatz verwendet. Die Anfärbung CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen erlaubte die direkte Analyse der in diesen Subpopulationen auftretenden Reaktionen, was bei Reaktionen in beiden Subpopulationen von Vorteil sein konnte. Für die Nachtestung identifizierter Peptide nach der Epitop-Kartierung wurde eine Kombination von $10 \mu\text{l}$ anti-CD3-PerCP, $0.5 \mu\text{l}$ anti-CD8-APC, $10 \mu\text{l}$ anti-CD69-PE und $10 \mu\text{l}$ anti-IFN- γ -FITC pro Ansatz gewählt. Die Färbung des frühen Aktivierungsparameters CD69 ermöglichte eine genauere Analyse der T-Zell-Antwort [66].

3.3.4. *Nachtestung einzelner Peptide mit und ohne Zusatz kostimulatorischer Antikörper*

Um den Einfluss kostimulatorischer Antikörper auf die T-Zell-Antwort im oben beschriebenen Versuchsaufbau zu untersuchen, wurden jeweils 200 µl Kulturmedium in ein 2052-Falcon-Röhrchen pipettiert, 2 µl eines 1 mg/ml konzentrierten Einzelpeptids zugegeben und vorsichtig resuspendiert. 101 µl dieses Ansatzes wurden in ein zweites 2052-Falcon-Röhrchen überführt und diesem Ansatz je 1 µl anti-CD28 und anti-CD49d (Endkonzentration: 1 µg/ml) zugegeben. Diese Verfahrensweise gewährleistete gleiche Peptidkonzentrationen in beiden Ansätzen. Zwei mit 4 µl DMSO versetzte Negativkontrollen, die eine ohne, die andere mit 1 µg/ml anti-CD28 und anti-CD49d, wurden ebenfalls mitgeführt. Anschließend wurden PBMC eines Patienten zugeben, bei dem Stimulation mit dem jeweiligen Peptid zu CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zell-Antworten führte. Die Zellen wurden nun wie unter Abschnitt 3.3.3 dargestellt weiterverarbeitet.

3.3.5. *Durchflusszytometrische Analyse*

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung von Antigenen auf und in einer Zelle mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Zellen werden dazu zunächst in einem Flüssigkeitsmantel als einzelne Partikel in laminare Strömung gebracht, bevor sie in die Messkammer eintreten. Dort trifft (monochromatisches) Laserlicht auf die einzelne Zelle - und damit auf die an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Durch das Laserlicht angeregt, emittieren diese ihrerseits Licht eines definierten Wellenlängenspektrums, das von Sensoren in der Messkammer als Impuls aufgenommen, verstärkt, und anschließend rechnergestützt aufbereitet wird. Gleichzeitig wird das Laserlicht je nach Beschaffenheit der getroffenen Zelle charakteristisch gestreut. Aus der Interpretation von Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter; ein globales Maß für die Grösse) und Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter; ein globales Maß für die Granularität) sind Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zelle möglich. Bei einem Vier-Farben-Durchflusszytometer wie dem FACSCalibur können durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit ähnlichen Absorptions-, aber unterschiedlichen Emissionsmaxima bis zu sechs Parameter (vier Antigene sowie Grösse und Granularität) gleichzeitig untersucht werden. Als Farbstoffe wurden in dieser Arbeit Fluoreszein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Perdinin Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet. Die Interpretation der gemessenen Proben ist in Abbildung 4 (S.30) und in [67] dargestellt.

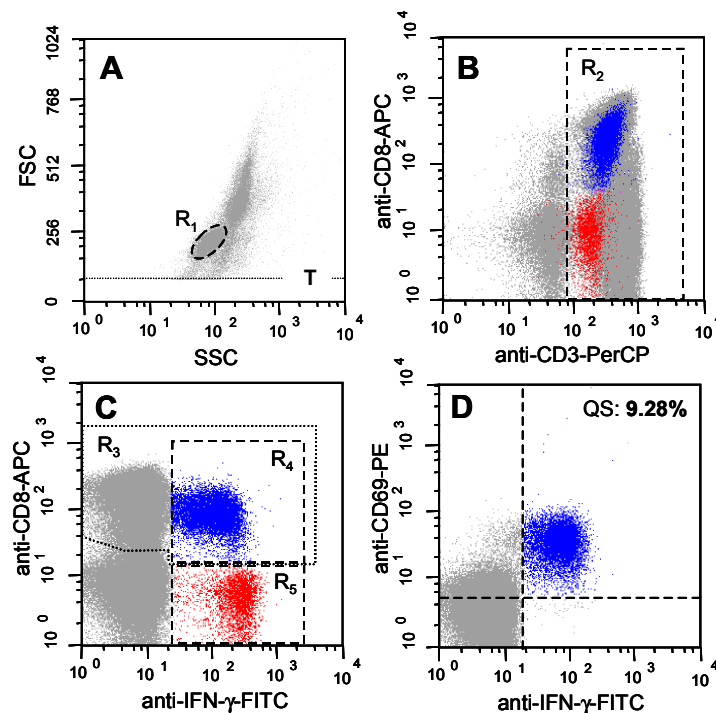


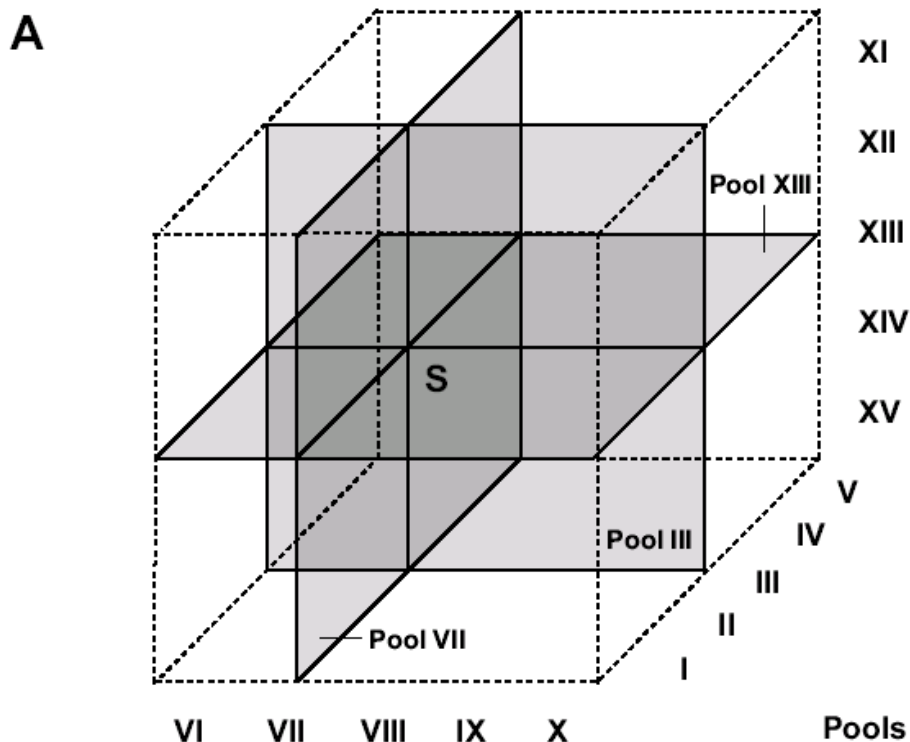
Abbildung 4 Die durchflusszytometrische Analyse HCMV-spezifischer T-Zell-Reaktionen folgte immer den gleichen Prinzipien. Wie hier am Beispiel von Pt-9 dargestellt, wurden PBMC für 6 h mit Pentadecapeptiden (in diesem Fall mit einem Pool aus 138 sich überlappenden Pentadecapeptiden, die die gesamte Sequenz von pp65 abdeckten, „Gesamt Mischung“) stimuliert. Anschließend wurden 250.000 Zellen („Events“) gemessen. Mit Region 1 (R₁) wurden kleine, vitale Lymphozyten ausgewählt („gating“); ein Schwellenwert („Threshold“, T) wurde festgelegt, um die Datenmenge zu reduzieren (A). CD3⁺ T-Zellen wurden durch R₂ definiert (B). Infolge der Stimulation mit Antigen kommt es oft zu einer ausgeprägten Herabregulierung des TCR/CD3-Komplexes, ersichtlich durch Vergleich der geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität („X-Geo-Mean“) von CD8⁺ (blau) und v.a. CD4⁺ T-Zellen (rot) mit dem der nicht Antigen-spezifischen T-Zellen (grau), was beim „Gating“ entsprechend berücksichtigt werden musste. Die Herabregulierung schließt CD4 und CD8 mit ein, hier in (C) erkennbar am niedrigeren Y-Geo-Mean der CD8⁺ Antigen-spezifischen Zellen im Vergleich zu Zellen, die nicht reagierten (grau). Wenn Reaktionen in beiden Subpopulationen auftraten, erlaubte die hohe Farbeintensität von anti-CD8-APC eine saubere Trennung der reagierenden Populationen auch bei ausgeprägter Herabregulierung. Diese musste bei der Quantifizierung der CD8⁺/IFN-γ⁺ T-Zellen ggf. durch eine Anpassung von R₄ berücksichtigt werden. Bei der initialen Epitop-Kartierung wurde eine Kombination von anti-CD4-PE und anti-CD8-APC verwendet, um die direkte Beurteilung der jeweiligen Population zu ermöglichen. Bei der Nachtestung einzelner Peptide wurde statt CD4 der frühe Aktivierungsmarker CD69 gefärbt (D). Die Bestimmung CD69⁺/IFN-γ⁺ T-Zell-Frequenzen erfolgte dann mittels Quadranten-Statistik (QS). Der „Background“ (Hintergrundrauschen) wurde in der unstimulierten Kontrolle auf gleiche Weise bestimmt und von der Reaktion abgezogen. Häufig wurde ein höherer X-Geo-Mean der CD4⁺ im Vergleich zur CD8⁺ T-Zell-Population festgestellt, was auf eine größere Menge von intrazellulärem IFN-γ als bei CD8⁺ T-Zell-Populationen hinweist.

3.3.6. *Methoden der T-Zell-Epitop-Kartierung*

Die Prinzipien der durchflusszytometrischen T-Zell-Epitop-Kartierung sind mehrfach detailliert dargestellt worden [30, 31, 32, 68, 69]. Dazu wurden die HCMV-Proteine IE-1 und pp65 (Aminosäure-Sequenzen des HCMV-Laborstamms AD169) in Form von Pentadecapeptiden (15-mere) synthetisiert, die sich um jeweils 11 Aminosäuren überlappten. Für IE-1 waren dazu 120, für pp65 138 solcher Pentadecapeptide erforderlich (Tabelle 5 und 6, S.24 und 25). Dieser Ansatz hatte zwei wesentliche Charakteristika: einerseits war jedes denkbare CD8⁺ Epitop von 8 bis 11 Aminosäuren Länge in mindestens einem dieser 15-mere enthalten. Andererseits konnten die Pentadecapeptide auch CD4⁺ T-Zell-Antworten induzieren. Um die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Epitope identifizieren zu können, mussten jedoch nicht notwendigerweise 120 bzw. 138 einzelne Tests durchgeführt werden. Vielmehr war es möglich, durch Zusammenfassung einzelner Peptide zu Peptidpools, die Anzahl benötigter Tests deutlich zu reduzieren. In dieser Arbeit kamen dazu zwei Verfahren zum Einsatz. Bei Patienten mit komplexen Reaktionen gegen pp65 mussten bis zu 30 Peptide und mehr nachgetestet werden. Um die Anzahl der dazu erforderlichen Proben möglichst klein zu halten, wurden die sehr wahrscheinlichen „Kandidaten“ einzeln nachgetestet, während weniger wahrscheinliche „Kandidaten“ zu Pools entsprechend einer zweidimensionalen Matrix zusammengefasst wurden. Die T-Zell-Epitop-Kartierung selber wurde aus dem gleichem Grund erstmals mit einem System durchgeführt, das noch effizienter arbeitete. Hierzu wurden die 120 IE-1- und die 138 pp65-Pentadecapeptide entsprechend einer dreidimensionalen Matrix zusammengefasst (illustriert am Beispiel von IE-1 in Abb. 5, S.32).

3.3.7. *V β -Typisierung Peptid-spezifischer T-Zell-Reaktionen*

Die V β -Typisierung Peptid-spezifischer T-Zell-Populationen wurde wie folgt durchgeführt: PBMC wurden, wie unter Abschnitt 3.3.1 dargestellt, präpariert, mit Zellkulturmedium auf 1.0×10^6 Zellen/ml eingestellt und über Nacht vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden 2052-Falcon-Röhrchen mit 100 μ l Zellkulturmedium und 1 μ g eines zuvor als immunogen identifizierten einzelnen Peptids beschickt und je ein mit FITC und ein mit PE markierter anti-V β -mAk zugegeben (z.B. anti-V β 1-PE und anti-V β 2-FITC). Zusätzlich wurden eine mit anti-Pan $\alpha\beta$ -PE gefärbte Probe sowie eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Schließlich wurden 400 μ l der Zellsuspension zugegeben und die Zellen wie oben (Abschnitt 3.3.3) weiterverarbeitet. Die intrazelluläre Färbung erfolgte nach 6-stündiger Stimulation mit anti-IFN- γ -APC, parallel zur Färbung mit anti-CD8-PerCP. Bei der anschliessenden Analyse wurden CD8^{high} Zellen ausgewählt („gating“)



B

Pool III					Pool VII					Pool XIII				
51	52	53	54	55	2	27	52	77	102	11	12	13	14	15
56	57	58	59	60	7	32	57	82	107	36	37	38	39	40
61	62	63	64	65	12	37	62	87	112	61	62	63	64	65
66	67	68	69	70	17	42	67	92	117	86	87	88	89	90
71	72	73	74	75	22	47	72	97		111	112	113	114	115

Abbildung 5 Das neue Verfahren der durchflusszytometrischen T-Zell-Epitop-Kartierung mit dreidimensionalem Peptidpool-Design war effizienter als die bisher verwendete Methode. Die 120 Pentadecapeptide, die die gesamte Aminosäure-Sequenz des HCMV-Proteins IE-1 umfassten, wurden dazu in 15 Peptidpools zu je 25 Peptiden zusammengefasst. Diese Pools waren entsprechend einer dreidimensionalen Matrix arrangiert: der resultierende „Würfel“ enthielt 5 transversale, 5 sagittale und 5 horizontale Pools. Drei solcher Pools sind in (A) eingezeichnet. Der dritte Transversal-Pool (Pool III) enthielt beispielsweise die Peptide 51 bis 75. Er teilte die Peptide 52, 57, 62, 67 und 72 mit dem zweiten sagittalen Pool (Pool VII) und die Peptide 61 bis 65 mit dem dritten horizontalen Pool (Pool XIII). Diese Peptide sind in (B) hellgrau hervorgehoben. Alle drei Pools hatten jedoch nur ein Pentadecapeptid gemeinsam („S“): Peptid 62 (dunkelgrau). In dem Fall, dass eine T-Zell-Reaktion in den Pools III, VII und XIII beobachtet wurde, konnte so IE-1₁₉₃₋₂₂₃ (Peptid 62) als verantwortliches Pentadecapeptid eindeutig identifiziert werden. Dieses Peptid führte bei Pt-30 und Pt-39 zu CD8⁺ T-Zell-Antworten. Für eine vollständige T-Zell-Epitop-Kartierung wurden so inkl. Negativ-Kontrolle und einem Pool, der alle Peptide enthielt („Gesamt Mischung“) statt 24 nur noch 17 Tests benötigt.

und die V β -Familien der CD8^{high}/IFN- γ ⁺ T-Zell-Populationen bestimmt. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 13 (S.61) wiedergegeben.

3.3.8. IFN- γ -Sekretions-Assay, MACS und durchflusszytometrische Feinsortierung

Zur Separation Peptid-spezifischer T-Zellpopulationen wurde nach Stimulation mit dem jeweiligen Peptid ein Sekretions-Assay mit anschließender magnetischer Zellseparation und durchflusszytometrischer Feinsortierung durchgeführt. Die PBMC-Präparation erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1 erläutert.

- Die Zellen wurden dann mit Zellkulturmedium auf 2.0×10^6 Zellen/ml eingestellt und in einem 50 ml 2070-Falcon-Röhrchen über Nacht vorinkubiert.
- Nach Entnahme der für die V β -Typisierung benötigten Zellen wurden die verbleibenden Zellen mit $5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen des jeweiligen Peptids stimuliert (um maximale T-Zell-Frequenzen zu erreichen; in einem Falle wurden $2 \mu\text{g}/10^6$ Zellen verwendet).
- Nach 6 h Inkubation im Brutschrank (bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre) wurde das Röhrchen mit eiskaltem PBS aufgefüllt und bei 4°C mit 250 g für 10 min. zentrifugiert.
- Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert und in 80 μl kaltem Zellkulturmedium aufgenommen.
- Daraufhin wurden 20 μl eines anti-CD45- und anti-IFN- γ -spezifischen mAk zugegeben („catch reagent“) und die Zellen für 7 min. auf Eis inkubiert.
- Die Probe wurde in mehrere Aliquots von jeweils 5.0×10^6 Zellen geteilt, die Zellen wurden mit je 50 ml 37°C warmen Zellkulturmedium verdünnt (die Zellkonzentration in jedem 50 ml-Röhrchen betrug so 1.0×10^5 Zellen/ml) und im Brutschrank für 45 min. unter intermittierender Rotation inkubiert.
- Nach der Sekretionsphase wurden die Zellen zentrifugiert, das Medium abgesaugt und mit PBS/BSA/EDTA (MACS-Puffer) gewaschen (250 g, 10 min., 4°C).
- Anschließend wurden die Zellen wieder gepoolt, in 80 μl kaltem MACS-Puffer aufgenommen und 20 μl anti-IFN- γ -PE (detection antibody) zugegeben. Gleichzeitig erfolgte die Oberflächenfärbung mit anti-CD69-FITC, anti-CD14-PerCP und anti-CD8-APC. Ausserdem wurden 4 μl einer humanen Immunglobulin-Lösung (Octagam[®]) zugesetzt, um Fc-Rezeptoren abzusättigen. Die Probe wurden dann für 10 min. auf Eis inkubiert.
- Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und in 80 μl kalten MACS-Puffer resuspendiert, bevor 20 μl anti-PE-Microbeads zugegeben wurden und die Probe für 15 min. bei 6°C inkubiert wurde.

- Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 1 ml entgastem, kaltem MACS-Puffer aufgenommen und durch ein Filter auf eine LS Separationssäule (Miltenyi Biotec) gegeben, die sich in einem MidiMACS Magneten (Miltenyi Biotec) befand. Die Säule wurde dreimal mit entgastem MACS-Puffer gespült, bevor die zurückgehaltenen Zellen ausserhalb des Magnetfeldes über einer zweiten LS Säule ausgewaschen wurden. Der Separationsvorgang wurde dann noch einmal wiederholt.
- Die gereinigte CD8+/CD69+/IFN- γ + Zellpopulation wurde schließlich auf Eis gelagert und unmittelbar darauf im Deutschen Rheumaforschungszentrum mit Hilfe eines FACSVantage- oder FACSDiva-Cell-Sorters nachsortiert, um einen maximalen Reinheitsgrad zu erreichen.
- Die sortierten Zellen wurden schließlich in PBS aufgenommen und bei -20°C für die PCR-Analyse aufbewahrt. Ein Beispiel für die Separation einer Peptid-spezifischen CD8+ T-Zell-Reaktion ist in Abbildung 14 (S.62) gezeigt.

3.3.9. TCR- γ 1/2-PCR und FFA

Im Thymus erhält jede T-Zelle durch Rekombination spezifischer V-J- oder V-D-J-Segmente sowie Veränderungen im Bereich der Verknüpfungsstellen der Segmente (N-Region) eine individuelle TCR-DNA-Sequenz, die an die Tochterzellen weitergegeben wird. Bei Vorkommen klonaler Expansionen in einem Zellgemisch findet man daher zahlreiche T-Zellen mit gleichen TCR-Sequenzen (sog. monoklonale Zellen). Dieses Rearrangement umfaßt dabei alle Gensegmente: auch wenn die Zelle später einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimiert, werden die γ - und δ -Segmente ebenfalls rearrangiert. Die PCR ermöglicht eine schnelle Analyse dieser rearrangierten TCR-Gene, eine Methode, die z.B. Anwendung in der Dermatologie zur Diagnose kutaner T-Zell-Lymphome findet. Dabei werden überwiegend Rearrangements der TCR- γ -Gene untersucht, die im Vergleich zu den anderen TCR eine einfachere Struktur haben. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung für Dermatologie und Venerologie der Charité unter der Leitung von Dr. Lukowsky durchgeführt. Die Methode inklusive des Primer-Designs ist detailliert in [70] und [71] dargestellt.

- Zunächst wurde die DNA aus den frisch aufgetauten, gereinigten T-Zell-Populationen durch Behandlung mit Proteinase K isoliert.
- Anschließend wurden zwei TCR- γ -PCRs durchgeführt: die PCR-1 unter Verwendung der Konsensus-Primer VG1 und JG1/2, die Rearrangements der Gensegmente V γ 1-8 und J γ 1/2 amplifizierten, sowie die PCR-2 mit Primern für die Segmente V γ 9, V γ 10, V γ 11 und J γ 1/2

(VG9, VG10/11, JG1/2). Die PCR-Produkte wurden auf mit 2 % Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel auf erfolgreiche Amplifikation untersucht.

- Die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-Carboxy-fluorescein markierten Primer VG1 oder JG1/2 wurden anschließend der DNA-Fragmentanalyse durch ein ABI 310 PRISM DNA-Sequenzierungsgerät unterzogen.
- Die Trennungen wurden dann mittels „GeneScan 372“ Software analysiert. Die Klonalität einer T-Zell-Population wurde angenommen, wenn ein Peak die Profile der Fluoreszenzintensität mit einer „peak-height-ratio“ von mindestens Zwei dominierten [71].

3.3.10. Vorhersage der jeweils wahrscheinlichsten präsentierenden HLA-Allele und immuno-genen Nonamer-Sequenzen stimulierender Peptide

Für jedes Pentadecapeptid, das zu CD8⁺ T-Zell-Antworten führte, wurde mit Hilfe der über das Internet frei zugänglichen Datenbanken „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.bmi-heidelberg.com) und „BIMAS“ (www.bimas.cit.nih.gov) eine Vorhersage der jeweils wahrscheinlichsten präsentierenden HLA-Allele und in den 15-meren enthaltenen immunogenen Nonamer-Sequenzen durchgeführt. Zusätzlich wurden die HLA-Typen von Patienten und gesunden Probanden, die zuvor im Rahmen anderer Arbeiten von anderen Untersuchern kartiert worden waren und auf die gleichen Peptide reagierten, verglichen. Die Reaktivitäten dieser Probanden zeigen die Tabellen 7 und 8. Für Peptide, die zu CD4⁺ T-Zell-Reaktionen führten, waren die Möglichkeiten zur Vorhersage der präsentierenden HLA-Klasse-II-Allele begrenzter: da „BIMAS“ ausschließlich die Präsentation an Klasse-I-Allelen vorhersagt und das Repertoire von „SYFPEITHI“ nur vier DR-Allele umfaßt (DRB1*0101, 0301, 0401, and 1101), beruhte die Vorhersage hauptsächlich auf der HLA-Konformität von Patienten und gesunden Spendern, die auf gleiche Peptide CD4⁺ T-Zellreaktionen zeigten.

Tabelle 6: Reaktivitäten gesunder Probanden gegen IE-1-Pentadecapeptide, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden

Peptid	AS-Position	Amino-Säure-Sequenz	Proband	HLA-Typ	% CD4 ⁺ T-Zellen	% CD8 ⁺ T-Zellen
46	IE-1 ₁₈₁₋₁₉₅	AANKLGGLQAKARA	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.33
			Pr-18	A3 A24(9) B8 B35 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1)	-	1.01
			Pr-24	A3 A24(9) B37 B62(15); Klasse-II nicht typisiert	-	0.59
49	IE-1 ₁₉₃₋₂₀₇	ARAKKDELRRKMMYM	Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.15
			Pr-18	A3 A24(9) B8 B35 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1)	-	1.25
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.13
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	-	0.19
			Pr-34	A1 A24(9) B8 B18 DR3(52) DR7(53) DQ2 DQ3	-	4.82

Peptid	AS- Position	Amino-Säure- Sequenz	Pro band	HLA-Typ	% CD4+ T-Zellen	% CD8+ T-Zellen
50	IE-1 ₁₉₇₋₂₁₁	KDELRRKMMYMCYRN	Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.16
			Pr-18	A3 A24(9) B8 B35 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1)	-	0.60
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	-	0.25
			Pr-34	A1 A24(9) B8 B18 DR3(52) DR7(53) DQ2 DQ3	-	4.05
62	IE-1 ₂₄₅₋₂₅₉	EIMAYAQKIFKILDE	Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	0.71
73	IE-1 ₂₈₉₋₃₁₁	VTSDACMMTMYGGIS	Pr-11	A1 A3 B37 DR4(53) DR8(51) DQ4 DQ8(3)	-	3.34
77	IE-1 ₃₀₅₋₃₁₉	LSEFCRVLCYVLEE	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.02	0.59
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.78
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	1.11
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	2.48
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.02
78	IE-1 ₃₀₉₋₃₂₃	CRVLCYVLEETSVM	Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR/(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	-	0.13
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.22
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.28
			Pr-22	A2 A66(10) B7 B41 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)DQ7(3)	-	0.67
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.08
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	0.47
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	2.19
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.01
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	-	2.98
79	IE-1 ₃₁₃₋₃₂₇	CCYVLEETSVMIAKR	Pr-8	A2 B35 B37 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1)	-	0.13
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.02
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	-	0.11
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	-	1.08

Tabelle 7: Reaktivitäten gesunder Probanden gegen pp65-Pentadecapeptide, die in anderen Arbeiten beschrieben wurden

Peptid	AS- Position	Amino-Säure- Sequenz	Pro band	HLA-Typ	% CD4+ T-Zellen	% CD8+ T-Zellen
10	pp65 ₃₇₋₅₁	HETRLQLQTGIHVRVS	Pr-35	A2 A74(19) B51(5) B53 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.60
11	pp65 ₄₁₋₅₅	LLQTGIHVRVSQPSL	Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.05	-
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	0.24	-
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	0.01	-
28	pp65 ₁₀₉₋₁₂₃	MSIYVYALPLKMLNI	Pr-13	A30(19) A32(19) B49(21) B51(5) DR13(6; 52) DQ 6(1)	-	0.55
29	pp65 ₁₁₃₋₁₂₇	VYALPLKMLNIP SIN	Pr-23	A2 A33(19) B51(5) B58(17) DR3(52) DR12(5; 52) DQ2 DQ7(3)	0.10	-
30	pp65 ₁₁₇₋₁₃₁	PLKMLNIP SINVHHY	Pr-18	A3 A24(9) B8 B35 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1)	-	0.42
			Pr-23	A2 A33(19) B51(5) B58(17) DR3(52) DR12(5; 52) DQ2 DQ7(3)	0.15	-
31	pp65 ₁₂₁₋₁₃₅	LNIP SINVHHYPSAA	Pr-18	A3 A24(9) B8 B35 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1)	-	0.39
			Pr-36	A32 A68(28) B35DR1(51) DR16(2; 51)DQ5(1)	-	0.02
47	pp65 ₁₈₅₋₁₉₉	AFVFPTKDVALRHVV	Pr-36	A32 A68(28) B35DR1(51) DR16(2; 51)DQ5(1)	-	0.43
52	pp65 ₂₀₅₋₂₁₉	VCSMENTRATKMQVI	Pr-2	A30(19) A32(19) B13 B27 DR9(53) DR16(2; 51) DQ3 DQ5	-	1.92
			Pr-15	A2 A28 B27 B37 DR4(53) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ8(3)	-	2.05
			Pr-19	A1 A2 B44(12) B57(17) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.50

Peptid	AS- Position	Amino-Säure- Sequenz	Pro band	HLA-Typ	% CD4+ T-Zellen	% CD8+ T-Zellen
56	pp65 ₂₂₁₋₂₃₅	DQYVKVYLESFCEVD	Pr-35	A2 A74(19) B51(5) B53 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	3.37	-
66	pp65 ₂₆₁₋₂₇₅	QPFMRPHERNGFTVL	Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR7(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	-	0.22
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.05	0.08
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.20
			Pr-22	A2 A66(10) B7 B41 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	-	0.51
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.07
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	0.81
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	0.05
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	0.02	0.08
67	pp65 ₂₆₅₋₂₇₉	RPHERNGFTVLCPKN	Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR/(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	-	0.02
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.03
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.15
			Pr-22	A2 A66(10) B7 B41 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	-	0.65
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.06
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	0.33
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	0.03
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.03
71	pp65 ₂₈₁₋₂₉₅	I IKPGKISHIMLDVA	Pr-2	A30(19) A32(19) B13 B27 DR9(53) DR16(2; 51) DQ3 DQ5	0.16	-
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	0.05	-
72	pp65 ₂₈₅₋₂₉₉	GKISHIMLDVAFTSH	Pr-2	A30(19) A32(19) B13 B27 DR9(53) DR16(2; 51) DQ3 DQ5	0.16	-
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	0.08	-
82	pp65 ₃₂₅₋₃₃₉	QIFLEVQAIRETVEL	Pr-36	A32 A68(28) B35DR1(51) DR16(2; 51)DQ5(1)	-	0.13
91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSEHPTFTSQYRI	Pr-1	A1 A2 B52(5) B61(40) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	0.01	-
			Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR/(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	1.06	-
			Pr-10	A2 A31(19) B8 DR3(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	1.46	-
			Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	0.16	-
			Pr-30	A3 A30(19) B7 B51(5) DR13(6; 52) DQ6(1)	0.03	-
92	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSEHPTFTSQYRI	Pr-1	A1 A2 B52(5) B61(40) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	0.69	-
			Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR/(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	1.26	-
			Pr-10	A2 A31(19) B8 DR3(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	2.49	-
			Pr-12	A24(9) A32(19) B14 B44(12); Klasse-II nicht typisiert	0.36	-
			Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52)DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	0.58	-
			Pr-30	A3 A30(19) B7 B51(5) DR13(6; 52) DQ6(1)	0.03	-
			Pr-31	A11 A31(19) B15 B44(12) DR11(5; 52) DQ3	0.06	0.03
93	pp65 ₃₆₉₋₃₈₃	FTSQYRIQGKLEYRH	Pr-1	A1 A2 B52(5) B61(40) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	0.40	-
			Pr-3	A3 A26(10) B7 B38(16) DR/(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	1.13	-
			Pr-12	A24(9) A32(19) B14 B44(12); Klasse-II nicht typisiert	0,35	-
			Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	0.37	-
			Pr-30	A3 A30(19) B7 B51(5) DR13(6; 52) DQ6(1)	0.03	0.06
			Pr-31	A11 A31(19) B15 B44(12) DR11(5; 52) DQ3	0.02	-
104	pp65 ₄₁₃₋₄₂₇	TERKTPRVTGGGAMA	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.68
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.31
			Pr-22	A2 A66(10) B7 B41 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	-	0.54
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	0.08

Peptid	AS- Position	Amino-Säure- Sequenz	Pro band	HLA-Typ	% CD4+ T-Zellen	% CD8+ T-Zellen
105	pp65 ₄₁₇₋₄₃₁	TPRVTGGGAMAGAST	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.74
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.63
			Pr-22	A2 A66(10) B7 B41 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	-	0.96
			Pr-26	A1 A3 B7 B8 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.27
			Pr-28	A2 A23(9) B7 B13 DR7(53) DQ2 DQ3	-	0.10
122	pp65 ₄₈₅₋₄₉₉	PPWQAGILARNLVPM	Pr-1	A1 A2 B52(5) B61(40) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	0.07	0.01
123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AGILARNLVPMVATV	Pr-1	A1 A2 B52(5) B61(40) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ7(3)	0.19	0.18
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.06
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.18
			Pr-8	A2 B35 B37 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1)	-	2.57
			Pr-9	A2 A23(9) B35 B62(15) DR4(53) DR13(6; 52) DQ6(1) DQ8(3)	-	1.68
			Pr-10	A2 A31(19) B8 DR3(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	-	1.38
			Pr-15	A2 A28 B27 B37 DR4(53) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ8(3)	-	0.06
			Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.49
			Pr-19	A1 A2 B44(12) B57(17) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.18
			Pr-20	A2 A26(10) B56(22) B60(40) DR4(53) DR16(51) DQ5(1) DQ7(3)	-	3.65
			Pr-21	A2 B44(12) B50(21); Klasse-II nicht typisiert	-	0.50
			Pr-23	A2 A33(19) B51(5) B58(17) DR3(52) DR12(5; 52) DQ2 DQ7(3)	-	1.74
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	0.26
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.13
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	-	0.92
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	-	1.06
			Pr-35	A2 A74(19) B51(5) B53 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	1.83
124	pp65 ₄₉₃₋₅₀₇	ARNLVPMVATVQGQN	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.86
			Pr-5	A2 B7 B60(40) DR15(2; 51) DQ6(1)	-	0.35
			Pr-8	A2 B35 B37 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1)	-	2.34
			Pr-9	A2 A23(9) B35 B62(15) DR4(53) DR13(6; 52) DQ6(1) DQ8(3)	-	0.74
			Pr-10	A2 A31(19) B8 DR3(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3	-	1.14
			Pr-15	A2 A28 B27 B37 DR4(53) DR15(2; 51) DQ6(1) DQ8(3)	-	0.08
			Pr-17	A1 A2 B8 B60(40) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.37
			Pr-19	A1 A2 B44(12) B57(17) DR11(5; 52) DR17(3; 52) DQ2 DQ7(3)	-	0.19
			Pr-20	A2 A26(10) B56(22) B60(40) DR4(53) DR16(51) DQ5(1) DQ7(3)	-	3.04
			Pr-21	A2 B44(12) B50(21); Klasse-II nicht typisiert	-	0.49
			Pr-23	A2 A33(19) B51(5) B58(17) DR3(52) DR12(5; 52) DQ2 DQ7(3)	-	1.34
			Pr-27	A2 A24(9) B7 B13 DR7(53) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	-	0.72
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	-	0.06
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	-	0.63
			Pr-35	A2 A74(19) B51(5) B53 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	1.49
127	pp65 ₅₀₅₋₅₁₉	GQNLKYQEFFWDAND	Pr-2	A30(19) A32(19) B13 B27 DR9(53) DR16(2; 51) DQ3 DQ5	0.16	-
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.04	0.35
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	0.26	-
128	pp65 ₅₀₉₋₅₂₃	KYQEFFWDANDIYRI	Pr-2	A30(19) A32(19) B13 B27 DR9(53) DR16(2; 51) DQ3 DQ5	0.12	-
			Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.20	0.35
			Pr-29	A2 A11 B18 B39 DR8(51) DR13(6; 52) DQ4 DQ6(1)	0.02	-
			Pr-32	A2 B8 B50(21) DR3(52) DR4(53) DQ2 DQ3	0.02	-
			Pr-33	A2 A26(10) B27 B44(12) DR1(51) DR4(53) DQ3 DQ5(1)	0.31	-
129	pp65 ₅₁₃₋₅₂₇	FFWDANDIYRIFAEAL	Pr-4	A2 A3 B7 DR13(6; 52) DR15(2; 51) DQ6(1)	0.18	-
131	pp65 ₅₂₁₋₅₃₅	YRIFAELEGVWPAA	Pr-35	A2 A74(19) B51(5) B53 DR1(51) DR15(2; 51) DQ5(1) DQ6(1)	-	0.20

4. Ergebnisse

Der durchflusszytometrische Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen nach Kurzzeit-Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung kann sowohl in Vollblut wie auch unter Verwendung von PBMC durchgeführt werden [63, 66, 72, 73]. Für beide Methoden waren bereits Versuchsprotokolle im Institut etabliert. Ein systematischer Vergleich beider Verfahren hatte aber bisher nicht stattgefunden. Ein erster Teil methodischer Arbeiten diente daher der Etablierung eines möglichst effektiven Protokolls für alle weiteren Versuche mit intrazellulärer Zytokinfärbung (Abschnitt 4.1). Vor allem sollte mit den parallel in Vollblut und PBMC durchgeführten Dosis-Wirkungskurven untersucht werden, welcher Ansatz sich besser für die Stimulation und die anschließende intrazelluläre Zytokinfärbung eignet und welche Konzentration der verwendeten Antigene optimale Ergebnisse erbringt. Zusätzlich wurden der Einfluss verschiedener Antikoagulanzen und die Verwendung kostimulatorischer monoklonaler Antikörper auf die Methode untersucht. In einem zweiten Teil methodischer Versuche wurden Versuchsprotokolle für die Anreicherung Peptid-spezifischer T-Zell-Populationen und deren Analyse durch TCR- γ 1/2-PCR und Fragment-Analyse fluoreszenzmarkierter PCR-Amplifikate (FFA) etabliert. IFN- γ -Sekretions-Assay, magnetische Zellseparation (MACS) und nachfolgende durchflusszytometrische Feinsortierung sowie die V β -Typisierung HCMV-spezifischer T-Zell-Reaktionen (v.a. die zeitgleich mit der Stimulation erfolgende Oberflächenfärbung der V β -Ketten) wurden mit PBMC von gesunden Probanden getestet, bevor sie für die Untersuchung der Patienten angewendet wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind hier nicht dargestellt. Unter Abschnitt 4.2 sind die Ergebnisse von Epitop-Kartierung und der Klonalitätsanalyse beschrieben. Abschnitt 4.3 fasst die Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten zusammen.

4.1. Ergebnisse der methodischen Arbeiten

4.1.1. *Antikoagulanzenvergleich in Vollblut und PBMC*

Der Effekt gebräuchlicher Antikoagulanzen auf den Vollblut- und PBMC-Versuchsaufbau wurde bei drei Probanden mit bekannten T-Zell-Reaktivitäten auf einzelne IE-1- und pp65-Pentadecapeptide verglichen. Dazu wurde den Probanden venöses Vollblut in Natrium-Heparin-, Lithium-Heparin- und Citrat-Monovetten abgenommen; aus einem Teil des Materials wurden PBMC präpariert, welche dann zeitgleich mit den Vollblutansätzen mit je 10 μ g/ml der entsprechenden Pentadecapeptide für 6 h stimuliert wurden. Wie Abbildung 6 (S.40) zeigt, hatte die

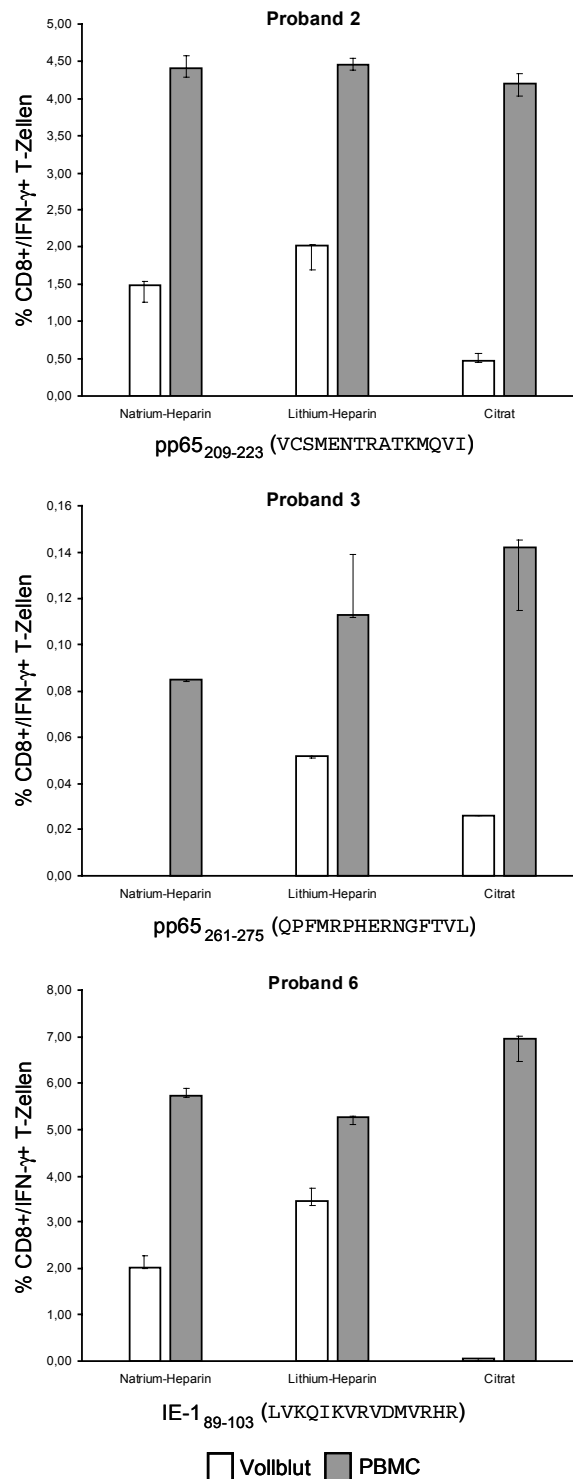


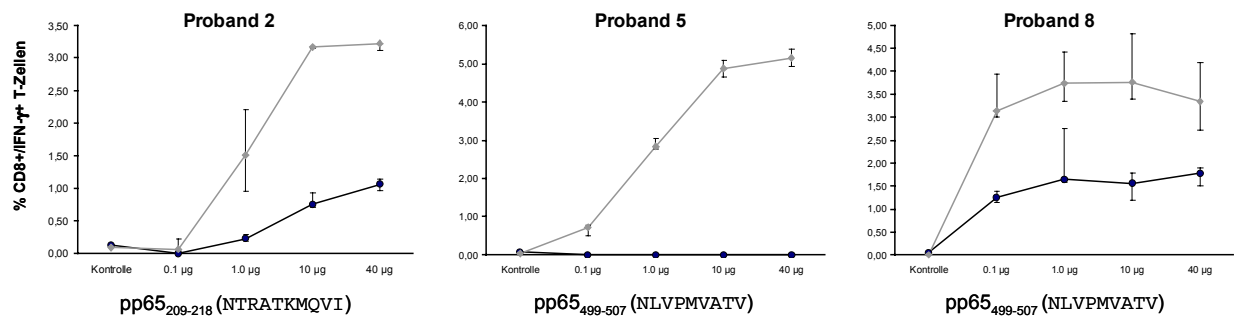
Abbildung 6 Verschiedene Antikoagulanzen hatten keinen nennenswerten Einfluss auf die intrazelluläre Zytokinfärbung im PBMC-Versuchsaufbau; Citrat zeigte dagegen einen deutlich inhibitorischen Effekt im Vollblut. Vollblut und PBMC HCMV-seropositiver gesunder Probanden mit grossen Unterschieden in der Reaktionsstärke wurden für 6 h mit je 10 µg/ml eines einzelnen IE-1 oder pp65-Pentadecapeptids stimuliert. 250.000 Zellen wurden gemessen, CD3+/CD8+ T-Zellen ausgewählt und Frequenzen CD8+/IFN-γ+ T-Zellen bestimmt. Die Säulen geben die Medianwerte, die Balken jeweils Minimum bzw. Maximum der Dreifachansätze wieder. Der inhibitorische Effekt von Citrat im Vollblut ist auf den Entzug von Calcium zurückzuführen, das damit nicht für die T-Zell-Aktivierung zur Verfügung steht.

Wahl des gerinnungshemmenden Zusatzes im PBMC-Versuchsaufbau keinen erheblichen Einfluss auf die gemessenen T-Zell-Frequenzen. Im Vollblut-Versuchsaufbau wurden dagegen die höchsten Frequenzen in Lithium-heparinisiertem Blut gemessen. Wie erwartet zeigte Citrat einen deutlich inhibitorischen Effekt; dieses Salz bindet in den Proben Ca^{2+} , das damit nicht mehr für die Aktivierung der T-Zellen zur Verfügung steht. Auf die Stimulation von PBMC zeigte Citrat jedoch keinen nennenswerten Einfluss, was vermutlich auf die Auswaschung von Citrat bei der PBMC-Präparation und die Verwendung von 1640-RPMI-Medium zurückzuführen ist, das Ca^{2+} enthält. Die relativ grossen Unterschiede in den gemessenen Frequenzen, die bei Proband 3 beobachtet wurden, lassen sich v.a. auf die schwachen T-Zell-Antworten zurückführen; auf kleine Reaktionen hatte die Methode naturgemäss grösseren Einfluss, als auf starke T-Zell-Antworten, was sich in grösseren Schwankungen der gemessenen Werte niederschlagen konnte.

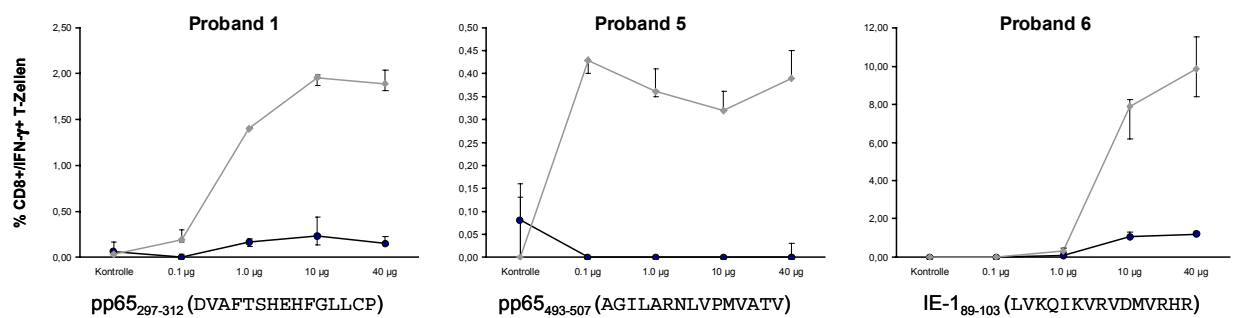
4.1.2. Dosis-Wirkungskurven für verschiedene Antigene in Vollblut und PBMC

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde Lithium-heparinisiertes Vollblut von sechs HCMV-seropositiven Probanden abgenommen, die bekannte CD8⁺ T-Zell-Reaktionen auf einzelne Nona- und Pentadecapeptide aus IE-1 bzw. pp65 sowie CD4⁺ T-Zell-Antworten gegen HCMV-Lysat hatten. (Bei Proband 2 wurde ein 10-mer verwendet, weil dieses zu wesentlich stärkeren Reaktionen als das entsprechende Nonamer führte). Um ein möglichst realistisches Modell zu erhalten, wurden gesunde Probanden mit grossen Unterschieden in der Reaktionsstärke ausgewählt. Aus einem Teil des Vollblutes wurden zunächst PBMC präpariert, bevor die Proben zeitgleich mit 0.1, 1, 10 und 40 µg/ml der entsprechenden Peptide bzw. 0.1, 1, 10 und 20 µg/ml viralem Lysat stimuliert wurden. Aus Kostengründen war eine Verwendung von 40 µg/ml HCMV-Lysat nicht möglich. Die beobachteten T-Zell-Antworten fielen dabei weitaus unterschiedlicher aus, als erwartet (Abb. 7, S.42). Bei manchen Probanden erreichten die T-Zell-Frequenzen sowohl in Vollblut als auch bei PBMC bei einer Antigenkonzentration von 10 µg/ml ein Plateau und konnten auch mit höheren Konzentrationen nicht weiter gesteigert werden (Pr-1, Pr-2, Pr-5). Bei anderen Probanden wurden die höchsten T-Zell-Frequenzen schon bei relativ niedrigen Antigen-Konzentrationen gemessen (Pr-2, Pr-7, Pr-8); höhere Konzentrationen hatten offensichtlich einen inhibitorischen Effekt. Dies war besonders bei den mit HCMV-Lysat stimulierten Proben der Fall, ein Ergebniss, das sich mit Beobachtungen von Meacker und Mitarbeitern [73] deckte, die dieses Phänomen auf die in HCMV-Lysat befindlichen immunmodulatorischen Moleküle zurückführten. Die Unterschiede zwischen den jeweils in Vollblut und PBMC gemessenen T-Zell-Frequenzen waren jedoch bei allen hier untersuchten Probanden konsistent.

(A) Nonapeptide



(B) Pentadecapeptide



(C) HCMV-Lysat

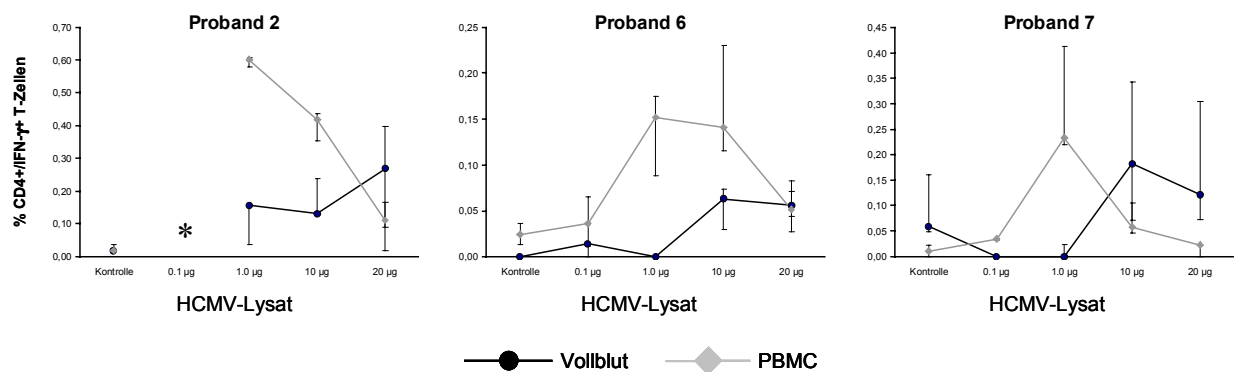


Abbildung 7 In allen Dosis-Wirkungskurven lagen die in PBMC gemessenen T-Zell-Frequenzen deutlich über den in Vollblut gemessenen und/oder waren schon bei wesentlich kleineren Antigen-Konzentrationen detektierbar. Lithium-heparinisiertes Vollblut und PBMC von sechs verschiedenen HCMV-seropositiven gesunden Probanden wurden für 6 h mit 0,1, 1, 10 und 40 µg/ml einzelner Nonapeptide (A) und Pentadecapeptide (B) sowie mit 0,1, 1, 10 und 20 µg/ml HCMV-Lysat (C) stimuliert (AD169). 250.000 Zellen wurden gemessen, CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen ausgewählt und anschließend die Frequenzen CD8+/IFN-γ+ bzw. CD4+/IFN-γ+ Zellen bestimmt. Die Punkte geben Median-Werte von Dreifachansätzen wieder, abzüglich der Werte der unstimulierten Kontrollen. Die Balken geben jeweils Minimum und Maximum der Dreifachansätze wieder. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen. (*) nicht durchgeführt

Die maximalen unter Verwendung von PBMC gemessenen T-Zell-Frequenzen waren im Vergleich zu Vollblut insgesamt deutlich höher und/oder wurden schon bei kleineren Antigenkonzentrationen erreicht. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen sind die Anwesenheit von Plasmaproteasen mit degradierendem Einfluss auf die verwendeten Antigene oder die unspezifische Bindung der Antigene an im Vollblut befindliche Plasmaproteine bzw. Erythrozyten.

4.1.3. T-Zell-Reaktionen mit und ohne kostimulatorische Antikörper

Waldrop und Mitarbeiter hatten gezeigt, dass die mit intrazellulärer Zytokinfärbung gemessenen CD4⁺ T-Zell-Frequenzen durch Zugabe monoklonaler Antikörper gegen CD28 und CD49d um das bis zu 2.75-fache gesteigert werden können [74]. Da dies insbesondere für die Analyse schwacher T-Zell-Antworten bei der Epitop-Kartierung sehr vorteilhaft hätte sein können, sollte der Effekt dieser exogenen Kostimulation - gerade auch für CD8⁺ T-Zell-Antworten - untersucht werden. Dazu wurden 20 CD8⁺ und 8 CD4⁺ T-Zellreaktionen immunsupprimierter Patienten auf einzelne IE-1- und pp65-Pentadecapeptide mit und ohne Zusatz kostimulatorischer Antikörper verglichen. Aufgrund der begrenzten Menge an Material konnten nur Einzelansätze durchgeführt werden. Die Versuchsanordnung gewährleistete jedoch gleiche Antigenkonzentrationen in beiden Proben (vgl. Abschnitt 3.3.4, S.28). Die CD8⁺ T-Zell-Frequenzen konnten durch Zugabe kostimulatorischer Antikörper tatsächlich ein wenig gesteigert werden (Wilcoxon-Rangtest; asymptotische 2-seitige Signifikanz: $p = 0.002$). Im Median waren die gemessenen Frequenzen um 12.02 % grösser als bei Proben ohne Kostimulation (Abb. 8A, S.44). Ähnliches galt für CD4⁺ T-Zell-Antworten (jedoch mit $p = 0.067$ nicht signifikant). Im Median verstärkte die exogene Kostimulation die CD4⁺ T-Zell-Antworten um 20.71 % (Abb. 8B). Bei einer Reihe von Proben waren die gemessenen T-Zell-Frequenzen allerdings ohne die exogene Kostimulation grösser als mit. Zudem war der beobachtete Effekt insgesamt nicht besonders ausgeprägt, weshalb auf die Zugabe von anti-CD28 und anti-CD49d in allen weiteren Versuchen verzichtet wurde.

4.1.4. Isotyp-Kontrollen und Positiv-Kontrollen mit PMA/Ionomycin

Bis dato war die Durchführung von Isotyp-Kontrollen und Positiv-Kontrollen mit PMA/Ionomycin integraler Versuchsbestandteil. Mit Isotypen soll das Ausmaß der unspezifischen Bindung eines gegen das intrazellulär zurückgehaltene Zytokin gerichteten Antikörpers bestimmt werden. Im vorangegangenen Projekt wurden die T-Zell-Frequenzen nach Stimulation mit IE-1- und pp65-„Gesamtgemischungen“ in PBMC der ebenfalls in dieser Studie untersuchten Patienten unter Verwendung eines identischen Versuchsprotokolls über ein halbes Jahr nach Transplantation verfolgt. Im Rahmen dieser Versuche wurden insgesamt mehr als 1.000 Isotyp-

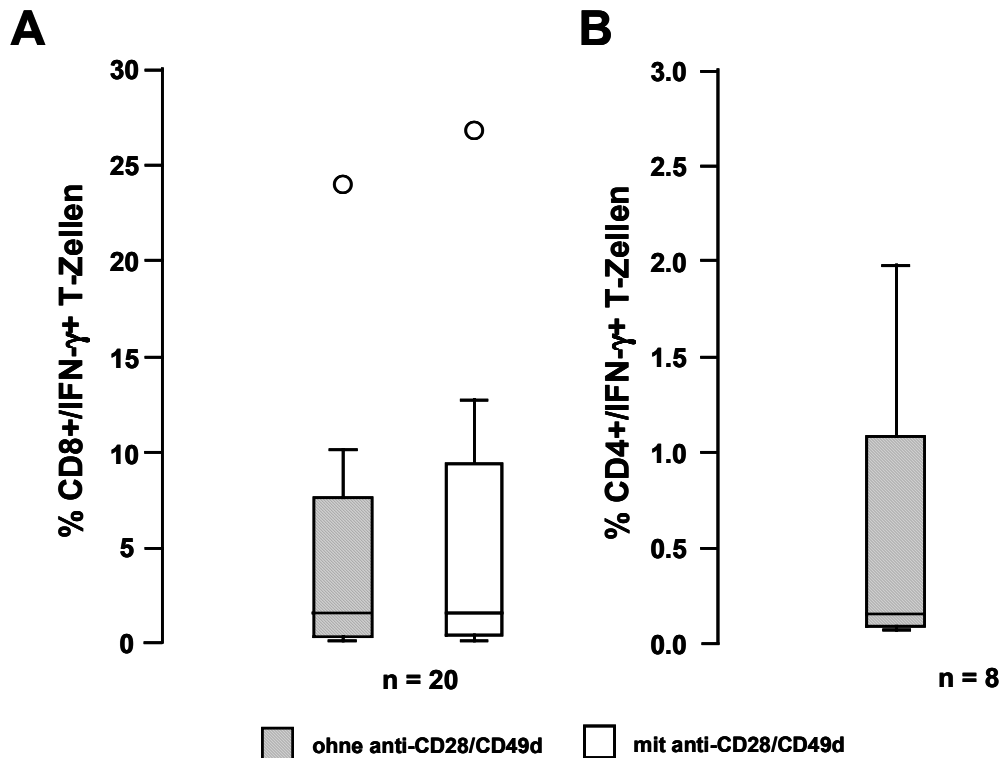


Abbildung 8 Der Zusatz exogener Kostimulation verstärkte CD4+ und CD8+ T-Zell-Antworten auf Kurzzeitstimulation mit einzelnen IE-1- und pp65-Pentadecapeptiden nur wenig. PBMC herz- und lungentransplanterter Patienten wurden 6 h mit einzelnen zuvor als immunogen identifizierten Peptiden stimuliert. Als Negativ-Kontrollen dienten unstimulierte Proben. Einer stimulierten Probe wie einer Negativ-Kontrolle wurden zusätzlich je 1 μ g/ml anti-CD28 und anti-CD49d zugesetzt. Die Boxplots zeigen die resultierenden T-Zell-Reaktionen mit und ohne Zusatz kostimulatorischer Antikörper (CD4+ bzw. CD8+/IFN- γ + T-Zellen in % der entsprechenden Subpopulation) für 20 CD8+ (A) und 8 CD4+ (B) T-Zell-Antworten. Der Effekt der exogenen Kostimulation war insgesamt nicht besonders ausgeprägt.

Kontrollen für stimulierte wie unstimulierte Proben gemessen. In keinem Fall konnte eine Bindung des murinen IgG2b Antikörpers beobachtet werden, die größer als der unspezifische „Background“ der Negativ-Kontrolle war (unstimulierte, mit anti-IFN- γ -FITC gefärbte Probe). Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung von Isotyp-Kontrollen verzichtet, ebenso wie auf die Durchführung von Positiv-Kontrollen mit PMA/Ionomycin. Der Informationsgehalt dieser Proben wurde als zu gering erachtet, um Patientenmaterial dafür aufzuwenden. Da die Stimulation mit immunogenen Pentadecapeptiden eine TCR-vermittelte Aktivierung von T-Zellen darstellt, eignet sich PMA/Ionomycin als TCR-unabhängige Stimulation nicht als Positiv-Kontrolle für diese Versuchsanordnung.

4.1.5. T-Zell-Epitop-Kartierung mit dreidimensionalem Peptidpool-Design

Die neue Technik der T-Zell-Epitop-Kartierung erwies sich als ebenso zuverlässig wie das früher von unserer Arbeitsgruppe eingeführte Verfahren, bei dem die Pentadecapeptide in Pools ent-

sprechend einer zweidimensionalen Matrix arrangiert waren [31, 32]. Die Anzahl der benötigten Proben für die vollständige Kartierung eines Proteins konnte dadurch für IE-1 von 24 auf 17 und für pp65 von 26 auf 18 reduziert werden (jeweils inkl. einer Negativ-Kontrolle und der entsprechenden „Gesamtmischung“). Zusätzlich wurde, wenn nötig, die Zellkonzentration auf bis zu 1.0×10^6 pro Ansatz reduziert, um das vorhandene Patientenmaterial optimal zu nutzen. Diese Zellkonzentration war in einem Grossteil der Fälle immer noch ausreichend, um die pro Ansatz angestrebte Zahl von 250.000 Zellen messen zu können und damit eine sorgfältige Analyse auch sehr kleiner Reaktionen ($< 0.05 \%$) zu gewährleisten. Da die Patienten zudem i.A. zu den Untersuchungszeitpunkten nicht mehr oder nur geringgradig lymphopenisch waren, konnte so in den meisten Fällen die vollständige Epitop-Kartierung eines Proteins aus den vom DHZB bei jedem Ambulanztermin eines Patienten zur Verfügung gestellten ca. 16 ml Vollblut durchgeführt werden. Die Abbildungen 9 (S.46) und 10 (S.47) zeigen jeweils ein Beispiel für eine T-Zell-Epitop-Kartierung von IE-1 bzw. pp65 mit dem neuen dreidimensionalen Peptidpool-Design. Die IE-1-Epitop-Kartierung in Abbildung 9 erfolgte - inkl. der Nachtestung der beiden identifizierten Peptide - aus ca. 16 ml Vollblut. Für das Beispiel in Abbildung 10 wurden zwei Termine benötigt.

4.2. Ergebnisse von T-Zell-Epitop-Kartierung und Klonalitätsanalyse

4.2.1. Übersicht über die Ergebnisse der T-Zell-Epitop-Kartierung

In der untersuchten Patientengruppe hatten 15 Patienten (75 %) messbare T-Zell-Antworten gegen IE-1 und 20 (100 %) gegen pp65. Diese T-Zell-Reaktionen waren, wie weiter oben schon erwähnt, für 6 Monate nach Transplantation nachverfolgt worden. Zunächst wurde das Protein, das die stärkere T-Zell-Antwort hervorrief, hinsichtlich der Einzelepitope analysiert. Vier Patienten kamen während des Untersuchungszeitraums oft genug in die Transplantationsambulanz, um die T-Zell-Antworten gegen beide Proteine untersuchen zu können. Insgesamt wurden 24 T-Zell-Epitop-Kartierungen durchgeführt, 8 von IE-1- und 16 von pp65-Reaktionen (Tab. 9, S.48). Nach der initialen Kartierung wurden alle in Frage kommenden Peptide einzeln nachgetestet. Peptide, die auf diese Weise als für die IFN- γ -Produktion verantwortlich identifiziert werden konnten, wurden einer „Restriktionsanalyse“ unterzogen. Dazu wurden zunächst die HLA-Typen

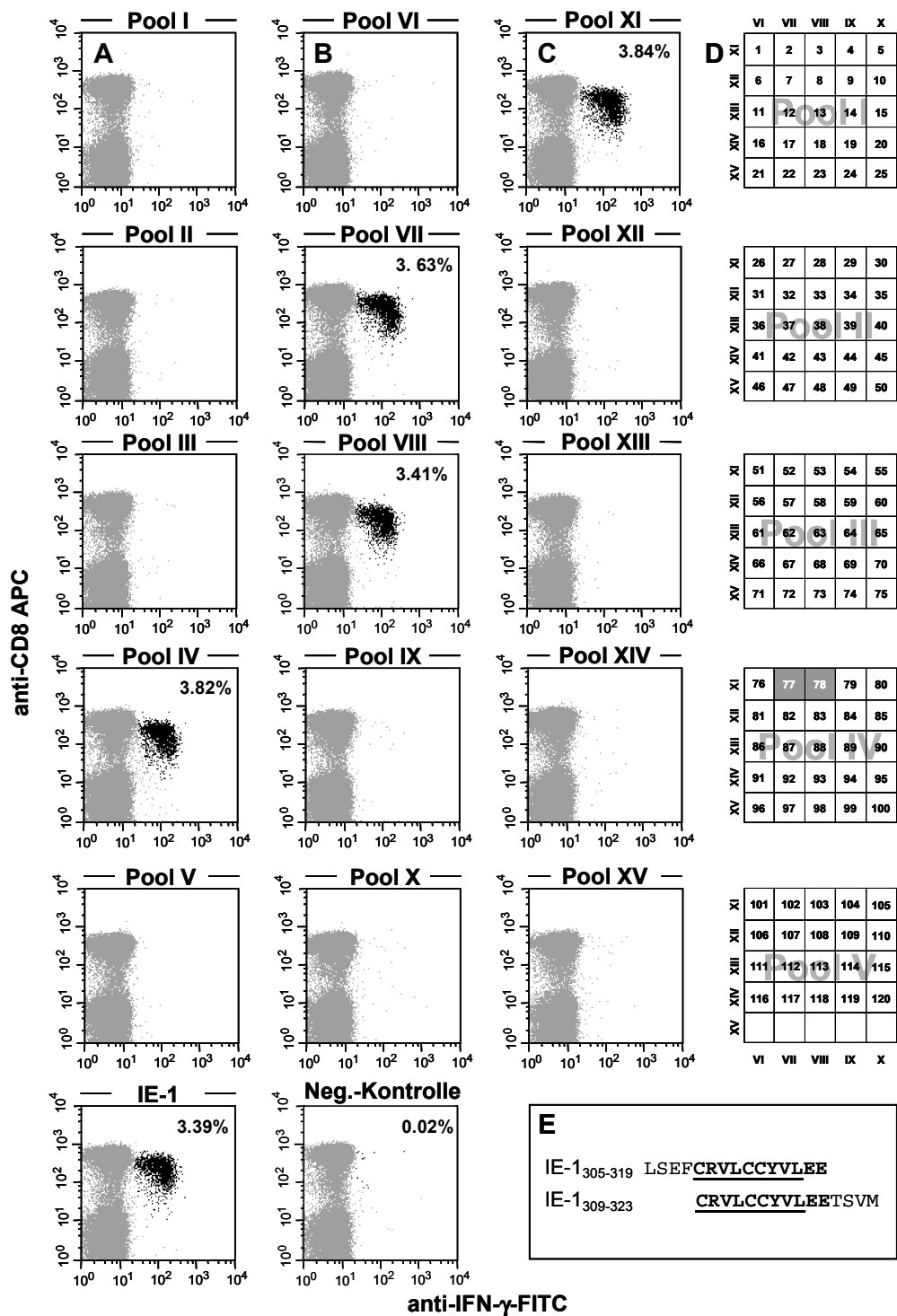


Abbildung 9 Die vollständige T-Zell-Epitop-Kartierung von IE-1 mit dem dreidimensionalen Peptidpool-Design erforderte nur noch ca. 16 ml Vollblut. PBMC dieser herztransplantierten Patientin (Pt-11) wurden für 6 h mit den 15 IE-1-Peptid-Pools sowie mit einem Pool stimuliert, der alle Pentadecapeptide enthielt („IE-1“). Die Dot Plots zeigen jeweils 100.000 CD3+/CD8+ T-Zellen; die Frequenzen der CD3+/CD8+/IFN-γ+ T-Zellen sind in der oberen rechten Ecke der Dot Plots dargestellt. Die linke Spalte (A) zeigt die transversalen Peptid-Pools I-V, die ganz rechte Spalte (D) zeigt die Nummern der Peptide, die in diesen Pools enthalten waren inkl. der immunogenen Peptide (grau). Zwischen diesen beiden Spalten sind die sagittalen Pools VI-X (B) sowie die horizontalen Pools XI-XV (C) dargestellt. Dies ist ein typisches Beispiel für eine T-Zell-Epitop-Kartierung von IE-1: ein einzelnes CD8+ T-Zell-Epitop, das in zwei sich überlappenden Peptiden enthalten war, wurde identifiziert (E). Dieses Epitop war das in der IE-1-Gruppe am häufigsten beobachtete.

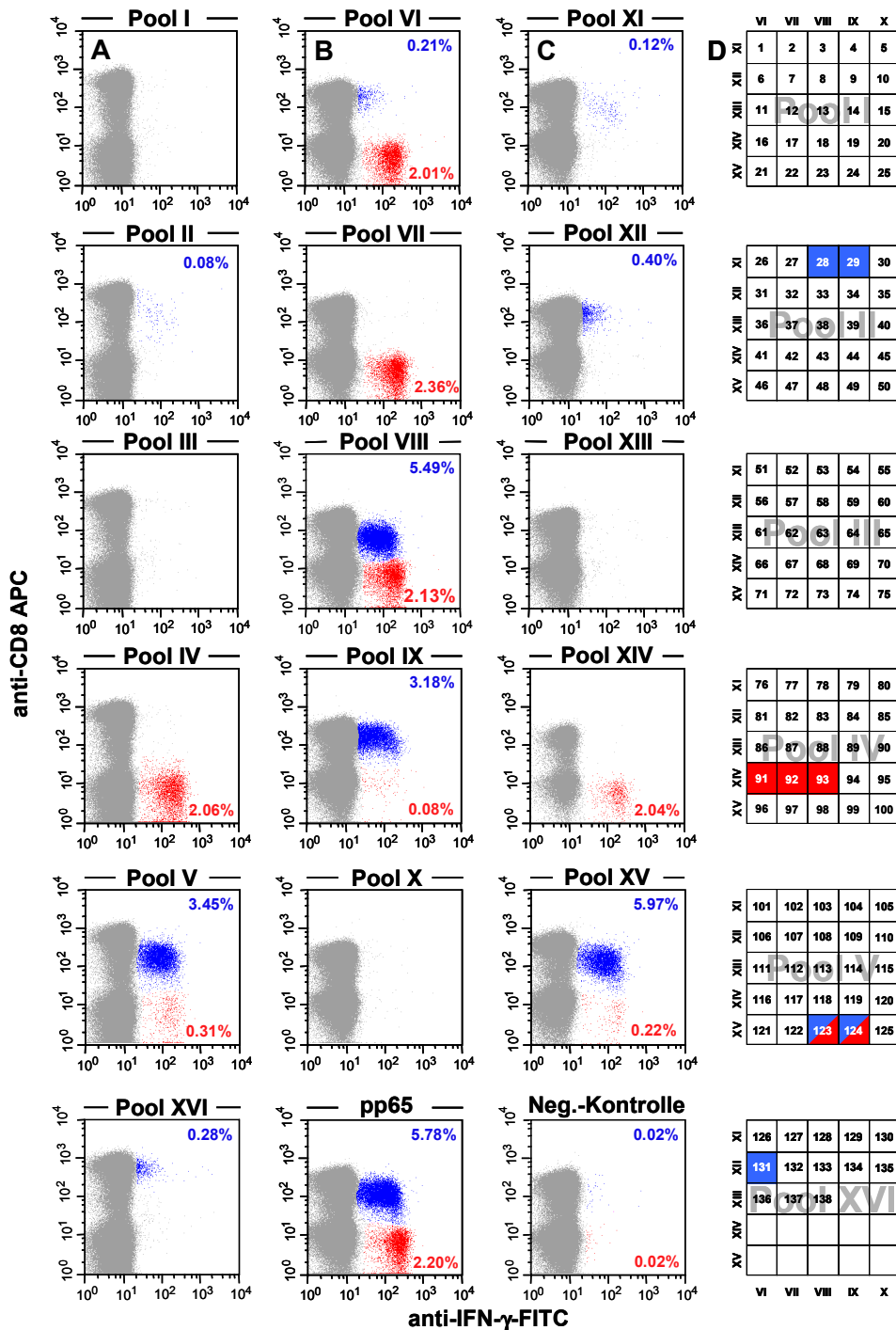


Abbildung 10 T-Zell-Epitop-Kartierung von pp65 mit dem dreidimensionalen Peptid-Pool-Design am Beispiel von Pt-9. PBMC dieses herztransplantierten Patienten wurden für 6 h mit den 16 pp65-Peptid-Pools sowie mit einem Pool stimuliert, der alle Pentadecapeptide enthielt („pp65“). Die Dot Plots zeigen 100.000 T-Zellen; die Frequenzen CD3+/CD8+/IFN-γ+ T-Zellen (blau) sowie CD3+/CD8-/IFN-γ+ (rot) sind in der oberen bzw. unteren rechten Ecke dargestellt. Die linke Spalte (A) zeigt die transversalen Peptid-Pools I-V und XVI, die ganz rechte (D) zeigt die Nummern der Peptide, die in diesen Pools enthalten waren. Die Peptide, die zu CD4+ und CD8+ T-Zell-Reaktionen führten, sind rot bzw. blau hervorgehoben. Zwischen beiden Spalten sind die sagittalen Pools VI-X (B) sowie die horizontalen Pools XI-XV (C) dargestellt. Pt-9 hatte eine komplexe T-Zell-Antwort, die sich gegen 2 CD4+ und 3 CD8+ T-Zell-Epitope richtete. Die Stimulation mit den Peptiden 123 und 124 führte zudem zu Reaktionen in beiden Subpopulationen. Obwohl in 10 der 16 Pools T-Zell-Antworten auftraten, war die eindeutige Identifizierung der Peptide noch möglich.

Tabelle 8: T-Zell-Reaktionen auf IE-1 und pp65 in der Patientengruppe¹

Patient	IE-1 [% d. CD4+ T-Zellen]	IE-1 [% d. CD8+ T-Zellen]	pp65 [% d. CD4+ T-Zellen]	pp65 [% d. CD8+ T-Zellen]	Kartierte(s) Protein(e)
Pt-2	0.00	0.43	0.14	0.07	IE-1
Pt-7	0.00	9.02	0.00	4.28	IE-1 und pp65
Pt-9	0.04	0.00	3.04	4.49	pp65
Pt-10	0.23	7.80	10.77	0.69	IE-1 und pp65
Pt-11	0.00	2.05	0.30	2.94	IE-1 und pp65
Pt-15	0.00	0.02	0.25	4.68	pp65
Pt-18	0.00	0.07	0.09	0.43	pp65
Pt-19	0.00	0.03	0.78	6.50	pp65
Pt-21	0.00	0.00	0.00	0.83	pp65
Pt-24	0.00	0.00	0.00	0.41	pp65
Pt-29	0.00	0.00	0.00	0.11	pp65
Pt-30	0.00	16.08	0.24	2.86	IE-1
Pt-31	0.00	0.94	0.00	4.34	IE-1 und pp65
Pt-32	0.00	0.35	0.00	0.49	pp65
Pt-34	0.00	10.78	0.08	0.16	IE-1
Pt-35	0.00	0.11	0.88	0.44	pp65
Pt-37	0.00	0.10	0.72	5.78	pp65
Pt-39	0.00	7.31	0.03	0.00	IE-1
Pt-40	0.00	0.68	0.99	0.39	pp65
Pt-43	0.00	0.00	1.59	0.24	pp65

¹dargestellt sind die letzten vor Beginn der T-Zell-Epitopkartierung gemessenen T-Zell-Frequenzen auf die „Gesamtgemischungen“ von IE-1 bzw. pp65; die jeweils dominierende Antwort ist **fett** gedruckt

von Patienten und gesunden Probanden verglichen, die auf die gleichen Peptide reagierten. Zusätzlich wurde für jedes Peptid eine Vorhersage der am wahrscheinlichsten präsentierenden HLA-Allele - im Falle von CD8-Reaktionen auch der wahrscheinlichsten immunogenen Nonamer-Sequenzen in diesen Peptiden - mittels der online-Datenbanken „SYFPEITHI“ und „BIMAS“ durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.10, S. 34). Dieses Verfahren sei am Beispiel des ersten in Tabelle 10 (S.50) aufgeführten Peptids erklärt:

Das Peptid IE-1₁₈₁₋₁₉₅ (Peptid 46, AANKLGALQAKARA) führte bei Patient 34 (Pt-34) und bei drei gesunden Probanden zu einer CD8+ T-Zell-Reaktion. Alle Spender hatten das Allel HLA-A3 gemein. Zusätzlich gaben beide Datenbanken HLA-A3 in Übereinstimmung als das wahrscheinlichste präsentierende HLA-Allel und **KLGGALQAK** als die wahrscheinlichste immunogene Nonamer-Sequenz an. Das war damit zu erklären, dass sich in Position 2 und 9 dieser Sequenz mit **L** bzw. **K** die idealen Bindungsanker für Allel HLA-A3 befanden [64]. Ausserdem wurde eine IFN- γ -Produktion bei der Epitop-Kartierung in nur genau drei Peptidpools festgestellt, was darauf hinwies, dass das Epitop in nur einem Pentadecapeptid enthalten war (ein Epitop, das in zwei Pentadecapeptiden enthalten war, erschien mindestens in vier Pools, vgl. Abb. 9, S.46).

Durch die Überlappung von 11 Aminosäuren zwischen aufeinanderfolgenden Pentadecapeptiden war nur jeweils eine einzige Nonamer-Sequenz ausschliesslich in einem Pentadecapeptid enthalten. Dabei handelte es sich um die Aminosäure-Sequenz, die sich genau in der Mitte des Pentadecapeptids befand und auf beiden Seiten von je drei Aminosäuren flankiert war. In IE-1₁₈₁₋₁₉₅ (Peptid 46) lautete diese Sequenz AANKLGGALQAKARA. Die Summe dieser Beobachtungen machte es damit sehr wahrscheinlich, dass dieses Peptid ein HLA-A3-restringiertes Nonamer-Epitop enthielt, dessen Aminosäure-Sequenz KLGGALQAK lautete. Als „beweisend“ können diese Resultate jedoch nicht angesehen werden.

Die Ergebnisse aller Peptid-Nachtestungen und der „Restriktionsanalyse“ sind in den Tabellen 10 und 11 (S.50-52) zusammengefasst. Alle bei Patienten und/oder gesunden Probanden als immunogen identifizierten IE-1- und pp65-Peptide sind zusätzlich in den Abbildungen 11 und 12 (S.53-54) dargestellt. Um diese „Epitop-Karten“ möglichst vollständig zu machen und dadurch einen Überblick über die bisher identifizierten Epitope in beiden Proteinen zu geben, sind alle weiteren bisher in der Literatur beschriebenen immunogenen Peptide ebenfalls eingezeichnet.¹

4.2.2. T-Zell-Epitopkartierungen und Restriktionsanalyse von IE-1

T-Zell-Epitop-Kartierungen von IE-1 wurden bei 7 herz- und 1 lungentransplantierten Patienten durchgeführt. Bei 7 Patienten wurde jeweils 1 Epitop identifiziert, bei einem Patienten 2 Epitope (Median: 1). Die Frequenzen Peptid-spezifischer T-Zellen lagen zwischen 1.07 % und 14.42 % der CD8⁺ T-Zellen (T-Zell-Frequenzen bei der Einzelpeptid-Nachtestung; Median: 1.49 %). Insgesamt wurden sechs verschiedene CD8⁺ T-Zell-Epitope in IE-1 identifiziert. CD4⁺ T-Zell-Antworten wurden nicht beobachtet. In IE-1₂₄₅₋₂₅₉ (Peptid 62, EIMAYAQKIFKILDE) war ein CD8⁺ T-Zell-Epitop enthalten, das zuvor noch nicht beschrieben wurde (Tab. 13, S.56). Zwei Patienten (Pt-30 und Pt-39) zeigten T-Zell-Reaktionen auf dieses einzelne Peptid, nicht aber auf die angrenzenden Peptide 61 oder 63. Diese Patienten hatten zwei HLA-Allele gemein, HLA-A24(9) und HLA-B15. Die Vorhersage ergab für HLA-A24(9) eine höhere Wahrscheinlichkeit, das präsentierende Allel zu sein. Das entsprechende Nonamer hatte zudem die Sequenz AYAQKIFKI, die Nonamer-Sequenz, die ausschliesslich in Peptid 62 enthalten war.

Für eine Reihe von IE-1-Peptiden wurde deutlich, dass sie von mehr als einem HLA-Allel präsentiert sein mussten (Tabelle 14, S.58). Der Abschnitt IE-1₁₉₃₋₂₁₁ (Peptide 49 und 50, ARAKKDELRRKMMYM und KDELRRKMMYMCYRN) enthielt beispielsweise das bereits als HLA-

¹ Auch nach ausgiebiger Literaturrecherche kann dabei aber nicht ausgeschlossen werden, dass Arbeiten übersehen wurden.

Tabelle 9: Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-I-Allele und immunogene Nonamere von IE-1-Peptiden, die CD8+ T-Zell-Antworten induzierten

Peptid	Aminosäure Position	Aminosäure-Sequenz Überlappendes 11-mer Immunogenes 9-mer	Präsentierendes HLA-Allel	Patient	HLA-Typ	% der CD8+ T-Zellen
46	IE-1 ₁₈₁₋₁₉₅	AANK <u>KLGGALQAK</u> ARA ^{1*}	HLA-A3	Pt-34	A1 A3 B51(5) B58(17)	6.70
49	IE-1 ₁₉₃₋₂₀₇	ARAK <u>KDELRRKMMY</u>	HLA-B18 ²	Pt-2	A25(10) A31(19) B18 B51(5)	1.49
50	IE-1 ₁₉₇₋₂₁₁	<u>KDELRRKMMY</u> CYRN	HLA-B18 ²	Pt-2	A25(10) A31(19) B18 B51(5)	1.20
62	IE-1 ₂₄₅₋₂₅₉	EIM <u>AYAQKIFKI</u> LDE ^{1, 3}	HLA-A24(9)	Pt-30	A2 A24(9) B15 B51(5) Bw4 Bw6	10.02
				Pt-39	A24(9) A32(19) B15 B44(12) Bw4 Bw6	8.57
72	IE-1 ₂₈₅₋₂₉₉	NEYK <u>VTSDACMMTY</u>	HLA-A1	Pt-10	A1 B8 B63(B15) Bw4 Bw6	11.78
73	IE-1 ₂₈₉₋₃₁₁	<u>VTSDACMMTY</u> GGIS	HLA-A1	Pt-10	A1 B8 B63(B15) Bw4 Bw6	4.69
77	IE-1 ₃₀₅₋₃₁₉	LSEF <u>CRVLCYVLEE</u> *	HLA-B7 ²	Pt-7	A2 A3 B7 B15 Bw6	14.42
				Pt-11	A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7	3.40
				Pt-31	A2 B7 B15 Bw4 Bw6	1.58
78	IE-1 ₃₀₉₋₃₂₃	<u>CRVLCYVLEE</u> TSVM*	HLA-B7 ²	Pt-7	A2 A3 B7 B15 Bw6	13.11
				Pt-11	A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7	3.40
				Pt-31	A2 B7 B15 Bw4 Bw6	1.08
78	IE-1 ₃₀₉₋₃₂₃	CRVLC <u>YVLEETSVM</u>	HLA-A3 ²	Pt-34	A1 A3 B51(5) B58(17) Bw4	2.10
79	IE-1 ₃₁₃₋₃₂₇	CC <u>YVLEETSVM</u> LAKR	HLA-A3 ²	Pt-34	A1 A3 B51(5) B58(17) Bw4	1.07

Tabelle 10: Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-I-Allele und immunogene Nonamere von pp65-Peptiden, die CD8+ T-Zell-Antworten induzierten

Peptid	Aminosäure Position	Aminosäure-Sequenz Überlappendes 11-mer Immunogenes 9-mer	Präsentierendes HLA-Allel	Patient	HLA-Typ	% der CD8+ T-Zellen
28	pp65 ₁₀₉₋₁₂₃	MSIYVYAL <u>PLKMLNI</u> *	HLA-A2 ²	Pt-9	A2 A26(10) B27 B51(5) Bw4	0.17
29	pp65 ₁₁₃₋₁₂₇	VYAL <u>PLKMLNIP</u> SIN	HLA-A2 ²	Pt-9	A2 A26(10) B27 B51(5) Bw4	0.17
				Pt-18	A2 A3 B18 B56(22) Bw6 Cw1 Cw5	0.02
30	pp65 ₁₁₇₋₁₃₁	PLKMLN <u>IP</u> SINVHHY	HLA-B35 ²	Pt-32	A2 A3 B18 B35 Bw6	0.13
				Pt-37	A11 A25(10) B8 B35 Bw6	0.69
31	pp65 ₁₂₁₋₁₃₅	LN <u>IP</u> SINVHHYPSAA	HLA-B35	Pt-32	A2 A3 B18 B35 Bw6	0.20
				Pt-37	A11 A25(10) B8 B35 Bw6	0.83
40	pp65 ₁₅₇₋₁₇₁	WQARLT <u>VSGLA</u> WTRQ ³	HLA-A68(28)	Pt-35	A30(19) A68(28) B13 B60(40) Bw4 Bw6	0.10
41	pp65 ₁₆₁₋₁₇₅	L <u>TVSGLA</u> WTRQQNQW ³	HLA-A68(28)	Pt-35	A30(19) A68(28) B13 B60(40) Bw4 Bw6	ND
47	pp65 ₁₈₅₋₁₉₉	AFVF <u>FPTKD</u> VALRHVV ^{2*}	HLA-A68(28)	Pt-24	A24(9) A68(28) B15 B51(5) Bw4 Bw6	0.59
				Pt-35	A30(19) A68(28) B13 B60(40) Bw4 Bw6	1.50
52	pp65 ₂₀₅₋₂₁₉	VC <u>SMENTRAT</u> KMQVI ²	HLA-A1	Pt-19	A1 A69(28) B53 B57(17) Bw4 Cw4 Cw6	3.85

Peptid	Amino- säure Position	Amino-Säure-Sequenz Überlappendes 11-mer Immunogenes 9-mer	Präsentierendes HLA-Allel	Patient	HLA-Typ	% der CD8+ T-Zellen
66	pp65 ₂₆₁₋₂₇₅	QPFMR <u>PPERNGF</u> TVL*	HLA-B7	Pt-7 Pt-11 Pt-15	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A1 A2 B7 B8 Bw6	0.08 0.87 1.14
67	pp65 ₂₆₅₋₂₇₉	R <u>PPERNGF</u> TVLCPKN*	HLA-B7	Pt-7 Pt-11 Pt-15	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A1 A2 B7 B8 Bw6	0.17 0.98 1.13
82	pp65 ₃₂₅₋₃₃₉	QIFLEVQ <u>AIRET</u> VEL	HLA-B35	Pt-21	A3 B35 B49(21) Bw4 Bw6	0.21
83	pp65 ₃₂₉₋₃₄₃	EVQ <u>AIRET</u> VELRQYD	HLA-B35	Pt-21	A3 B35 B49(21) Bw4 Bw6	1.46
91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSE <u>HPTFTS</u> QYRI	HLA-A1 ²	Pt-19 Pt-40	A1 A69(28) B53 B57(17) Bw4 Cw4 Cw6 A1 B8 B57(17) Bw4 Bw6	0.26 1.18
91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSE <u>HPTFTS</u> QYRI*	HLA-B35 ²	Pt-29 Pt-32 Pt-37	A2 A26(10) B35 B44(12) Bw4 Bw6 Cw4 Cw5 A2 A3 B18 B35 Bw6 A11 A25(10) B8 B35 Bw6	0.18 0.92 0.22
92	pp65 ₃₆₅₋₃₇₉	E <u>HPTFTS</u> QYRIQGL*	HLA-B35	Pt-29 Pt-32 Pt-37	A2 A26(10) B35 B44(12) Bw4 Bw6 Cw4 Cw5 A2 A3 B18 B35 Bw6 A11 A25(10) B8 B35 Bw6	0.15 ND 0.19
104	pp65 ₄₁₃₋₄₂₇	TERKT <u>PRVTGGG</u> AMA*	HLA-B7	Pt-7 Pt-11 Pt-15	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A1 A2 B7 B8 Bw6	0.78 0.78 2.86
105	pp65 ₄₁₇₋₄₃₁	T <u>PRVTGGG</u> AMAGAST*	HLA-B7	Pt-7 Pt-11 Pt-15	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A1 A2 B7 B8 Bw6	1.04 0.67 2.93
122	pp65 ₄₈₅₋₄₉₉	PPWQAG <u>ILARNL</u> VPM	HLA-A1	Pt-19	A1 A69(28) B53 B57(17) Bw4 Cw4 Cw6	0.92
123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AG <u>ILARNL</u> VPMVATV	HLA-A1 ²	Pt-19	A1 A69(28) B53 B57(17) Bw4 Cw4 Cw6	1.63
123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AG <u>ILARNL</u> VPMVATV*	HLA-A2 ²	Pt-7 Pt-9 Pt-11 Pt-18 Pt-29 Pt-31 Pt-43	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A26(10) B27 B51(5) Bw4 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A2 A3 B18 B56(22) Bw6 Cw1 Cw5 A2 A26(10) B35 B44(12) Bw4 Bw6 Cw4 Cw5 A2 B7 B15 Bw4 Bw6 A2 A23(9) B18 B49(21) Bw4 Bw6	0.03 9.94 0.28 1.63 0.14 6.43 0.45
124	pp65 ₄₉₃₋₅₀₇	AR <u>NL</u> VPMVATVQGN*	HLA-A2	Pt-7 Pt-9 Pt-11 Pt-15 Pt-18 Pt-29 Pt-31 Pt-43	A2 A3 B7 B15 Bw6 A2 A26(10) B27 B51(5) Bw4 A2 A3 B7 B37 Cw6 Cw7 A1 A2 B7 B8 Bw6 A2 A3 B18 B56(22) Bw6 Cw1 Cw5 A2 A26(10) B35 B44(12) Bw4 Bw6 Cw4 Cw5 A2 B7 B15 Bw4 Bw6 A2 A23(9) B18 B49(21) Bw4 Bw6	8.32 7.96 1.94 1.08 0.99 0.04 7.52 0.33
131	pp65 ₅₂₁₋₅₃₅	YRIFAE <u>LEGVWQ</u> PAA	HLA-B51(5)	Pt-9	A2 A26(10) B27 B51(5) Bw4	1.75

¹ Nonamer-Sequenz, die ausschließlich in diesem Pentadecapeptid enthalten war

² Peptid wurde von mehreren HLA-Allelen präsentiert (vgl. Tab. 14, S. 58)

³ Neu identifiziertes Epitop

*Experimentell gesicherte immunogene Sequenz

ND: nicht durchgeführt

Tabelle 11: Wahrscheinlich präsentierende HLA-Klasse-II-Allele von pp65-Peptiden, die CD4+ T-Zell-Antworten induzierten

Peptid	Amino-Säure Position	Amino-Säure-Sequenz (=immunogenes 15-mer)	Präsentierendes HLA-Allel	Patient	HLA-Typ	% der CD4+ T-Zellen
10	pp65 ₃₇₋₅₁	HETRLQLTGIHVRVS	HLA-DR15(2; 51)	Pt-40	DR3(52) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	2.41
11	pp65 ₄₁₋₅₅	LLQTGIHVRVSQPSL	HLA-DR15(2; 51)	Pt-40	DR3(52) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	2.78
56	pp65 ₂₂₁₋₂₃₅	DQYVKVYLESFCEDV ³	unbekannt	Pt-35	DR4(53) DR7(53) DQ2 DQ7(3)	0.25
57	pp65 ₂₂₅₋₂₃₉	KVYLESFCEDVPSGK ^{3, 4}	unbekannt	Pt-35	DR4(53) DR7(53) DQ2 DQ7(3)	0.21
63	pp65 ₂₄₉₋₂₆₃	DVEEDLTMTNRPQPF ^{3, 4}	unbekannt	Pt-40	DR3(52) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	0.17
66	pp65 ₂₆₁₋₂₇₅	QPFMRPHERNGFTVL ³	HLA-DR13(6; 52)	Pt-37	DR7(53) DR13(6; 52) DQ3 DQ6(1)	0.21
71	pp65 ₂₈₁₋₂₉₅	I IKPGKISHIMLDVA	HLA-DR4(53)	Pt-7 Pt-35	DR4(53) DR13(6; 52) DQ3 DQ6(1) DR4(53) DR7(53) DQ2 DQ7(3)	0.02 1.02
72	pp65 ₂₈₅₋₂₉₉	GKISHIMLDVAFTSH	HLA-DR4(53)	Pt-7 Pt-35	DR4(53) DR13(6; 52) DQ3 DQ6(1) DR4(53) DR7(53) DQ2 DQ7(3)	0.05 0.10
73	pp65 ₂₈₉₋₃₀₃	HIMLDVAFTSHEHFG	HLA-DR4(53)	Pt-35	DR4(53) DR7(53) DQ2 DQ7(3)	0.52
91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSEHPTFTSQYRI	HLA-DR11(5; 52)	Pt-9 Pt-43	DR8(51) DR11(5; 52) DQ3 DQ4 DR11(5; 52) DQ3	2.02 1.99
92	pp65 ₃₆₅₋₃₇₉	EHPTFTSQYRIQGKL	HLA-DR11(5; 52)	Pt-9 Pt-10 Pt-43	DR8(51) DR11(5; 52) DQ3 DQ4 DR7(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3 DR11(5; 52) DQ3	4.95 5.83 2.09
93	pp65 ₃₆₉₋₃₈₃	FTSQYRIQGKLEYRH	HLA-DR11(5; 52)	Pt-9 Pt-10 Pt-43	DR8(51) DR11(5; 52) DQ3 DQ4 DR7(53) DR11(5; 52) DQ2 DQ3 DR11(5; 52) DQ3	3.79 ND 1.98
122	pp65 ₄₈₅₋₄₉₉	PPWQAGILARNLVPM	HLA-DR11(5; 52)	Pt-10 Pt-11 Pt-19	DR7(53) DR8(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3 DR11(5; 52) DR14(6; 52) DQ5(1) DQ7(3) DR11(5; 52) DR13(6; 52) DR16(2; 51)	ND 1.11 0.24
123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AGILARNLVPMVATV	HLA-DR11(5; 52)	Pt-9 Pt-10 Pt-11 Pt-19 Pt-32 Pt-43	DR8(51) DR11(5; 52) DQ3 DQ4 DR7(53) DR8(52) DR11(5; 52) DQ2 DQ3 DR11(5; 52) DR14(6; 52) DQ5(1) DQ7(3) DR11(5; 52) DR13(6; 52) DQ1 DQ7(3) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ3 DQ6(1) DR11(5; 52) DQ3	0.29 0.83 1.00 0.19 0.03 0.11
124	pp65 ₄₉₃₋₅₀₇	ARNLVPMVATVQGQN	HLA-DR11(5; 52)	Pt-9 Pt-11 Pt-32 Pt-43	DR8(51) DR11(5; 52) DQ3 DQ4 DR11(5; 52) DR14(6; 52) DQ5(1) DQ7(3) DR11(5; 52) DR15(2; 51) DQ3 DQ6(1) DR11(5; 52) DQ3	0.29 0.52 ND 0.02
127	pp65 ₅₀₅₋₅₁₉	GQNLKYQEFFWDAND	unbekannt	Pt-15	DR3(52) DR7(53) DQ2 DQ3	0.07
128	pp65 ₅₀₉₋₅₂₃	KYQEFFWDANDIYRI	unbekannt	Pt-15 Pt-18 Pt-40	DR3(52) DR7(53) DQ2 DQ3 DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1) DR3(52) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	0.16 0.07 0.31
129	pp65 ₅₁₃₋₅₂₇	FFWDANDIYRIFAEL	unbekannt	Pt-18 Pt-40	DR1(51) DR17(3; 52) DQ2 DQ5(1) DR3(52) DR15(2; 51) DQ2 DQ6(1)	0.03 0.31

² Peptid wurde von mehreren HLA-Allelen präsentiert (vgl. Tab. 14, S. 58)

³ Neu identifiziertes Epitop

⁴ Kein anderer Patient oder gesunder Proband hat auf dieses Peptid reagiert. Eine Vorhersage des präsentierenden HLA- Allels war deshalb nicht mit ausreichender Sicherheit zu treffen.

ND: nicht durchgeführt

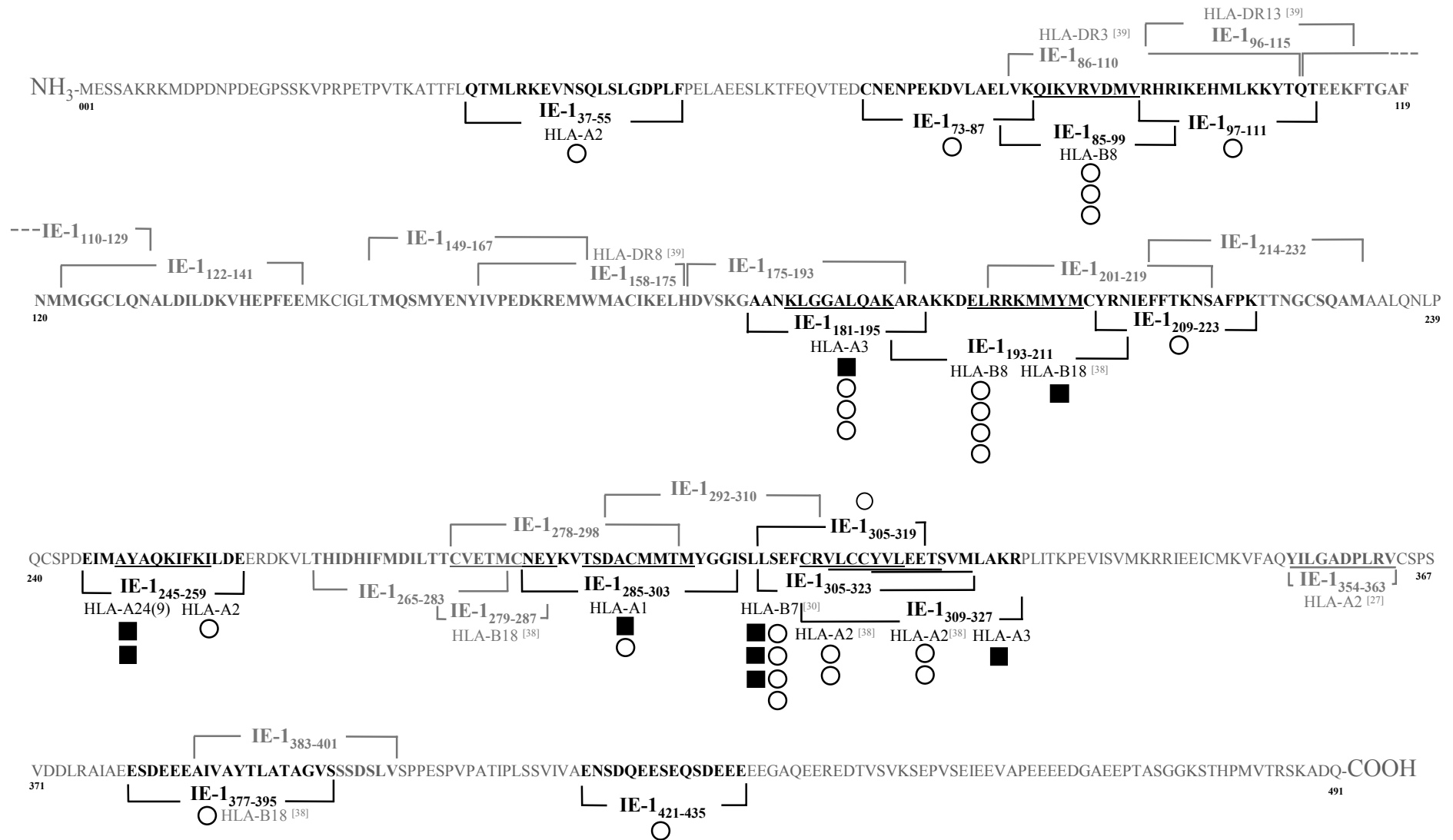


Abbildung 11 Synopsis der bisher in IE-1 identifizierten CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope. Die gesamte 491 Aminosäuren lange Primärstruktur von IE-1 ist dargestellt. CD4+ Epitope sind über, CD8+ Epitope unterhalb der Aminosäure-Sequenz eingezeichnet. Die immunogenen Sequenzen sind fett dargestellt und zusätzlich durch eckige Klammern markiert. Die (wahrscheinlichen) präsentierenden HLA-Allele und immunogenen Nonamer-Sequenzen sind angegeben, wo bekannt. Die Peptide, die in unserem Institut bei Patienten (■) oder gesunden Probanden (○) identifiziert wurden, sind schwarz gezeichnet. Epitope, die von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, sind grau dargestellt. Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen dabei auf die jeweilige Literaturangabe. Man beachte die Gebiete auffälliger „Epitop-Häufung“, wie z.B. die Region IE-1₃₀₅₋₃₂₇.

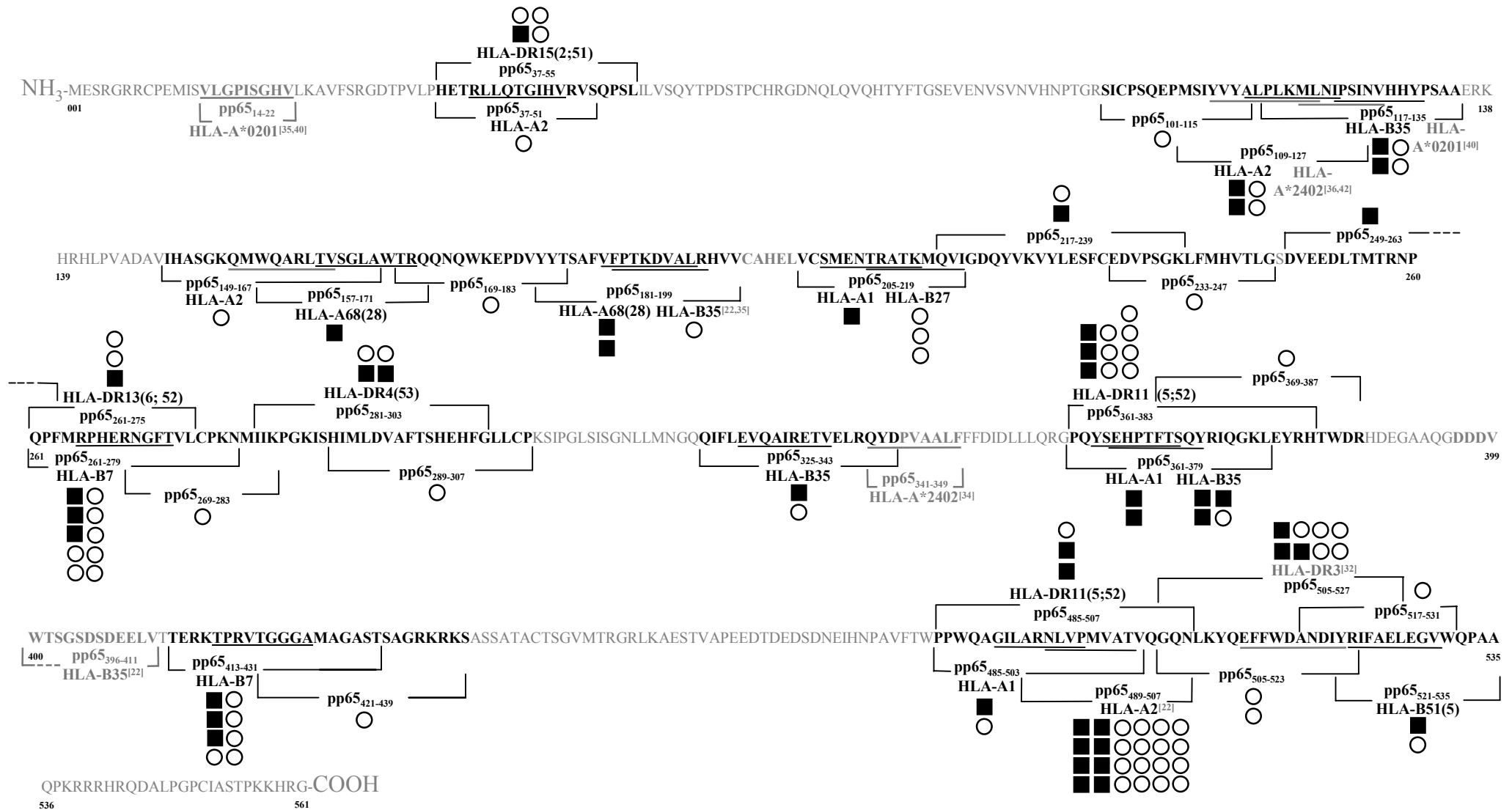


Abbildung 12 Synopse der bisher in pp65 identifizierten CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope. Die gesamte 561 Aminosäuren lange Primärstruktur von pp65 ist dargestellt. CD4+ Epitope sind über, CD8+ Epitope unterhalb der Sequenz eingezeichnet. Die immunogenen Sequenzen sind fett dargestellt und zusätzlich durch eckige Klammern markiert. Die wahrscheinlichen präsentierenden HLA-Allele und immunogenen Nonamer-Sequenzen sind angegeben, wo bekannt. Manche Peptide, wie z.B. pp65₄₈₉₋₅₀₃ (Peptid 123), führen zu CD4+ und CD8+ T-Zell-Reaktionen. Die Peptide, die in unserem Institut bei Patienten (■) oder Probanden (○) identifiziert wurden, sind schwarz gezeichnet. Epitope, die von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, sind grau dargestellt. Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen dabei auf die jeweilige Literaturangabe. Man beachte die Gebiete auffälliger „Epitop-Häufung“, wie z.B. die Region pp65₄₈₅₋₅₃₅.

B18-restringiert beschriebene Epitop **ELRRKMMYM** [38]. Diese Peptide führten auch bei einem HLA-B18-positiven Patienten (Pt-2) zu T-Zell-Reaktionen. Vier HLA-B18-negative gesunde Probanden hatten allerdings ebenfalls T-Zell-Antworten gegen beide Peptide. Diesen Probanden war das Allel HLA-B8 gemein. HLA-B8 wurde auch von beiden Datenbanken mit hoher Wahrscheinlichkeit als präsentierendes Allel und **ELRRKMMYM** als immunogenes Nonamer vorhergesagt. Zudem war ein von unserer Arbeitsgruppe generiertes, mit dem Peptid **ELRRKMMYM** beladenes HLA-B8-Tetramer in der Lage, T-Zellen gesunder Probanden zu färben (F. Kern, unpublizierte Daten). Das IE-1-Epitop, das in den Peptiden 49 und 50 enthalten war, wurde also von verschiedenen Allelen, von HLA-B8 und HLA-B18, präsentiert.

Schliesslich zeichneten sich Gebiete starker „Epitop-Häufung“ innerhalb der Primärstruktur von IE-1 ab. IE-1₃₀₅₋₃₁₉ (Peptid 77, LSEFCRVLC^{CCYV}LEE) enthielt beispielsweise das bekannte HLA-B7-restringierte Epitop **CRVLC^{CCYV}L** [22, 30]. Dieses Epitop war auch in dem angrenzenden Peptid IE-1₃₀₉₋₃₂₃ (Peptid 78, CRVLC^{CCYV}LEETSVM) enthalten. Eine Reihe von Patienten und Probanden reagierte auf diese beiden Peptide, alle hatten das Allel HLA-B7 gemein. Bei zwei gesunden Spendern führten die Peptide 78 und IE-1₃₁₃₋₃₂₇ (Peptid 79, CCYVLEETSVM^{LAKR}) zu T-Zell-Antworten, nicht aber Peptid 77. Diese Probanden waren HLA-B7-negativ, hatten aber beide das Allel HLA-A2. Die Vorhersage ergab die Sequenz **VLCCYVLEE** als von HLA-A2 präsentiertes Nonamer. Ebenso führten bei Patient 34 (Pt-34) IE-1₃₀₉₋₃₂₃ und IE-1₃₁₃₋₃₂₇ (Peptide 78 und 79) zu einer T-Zell-Antwort. Dieser Patient hatte jedoch keines von beiden Allelen, weder HLA-A2 noch HLA-B7; die Vorhersage ergab hier HLA-A3 als wahrscheinlich präsentierendes Allel und **YVLEETSVM** als zugehörige immunogene Nonamer-Sequenz. Das bedeutete, dass in dem Pentadecapeptid IE-1₃₀₉₋₃₂₃ (Peptid 78) drei verschiedene immunogene Nonamer-Sequenzen enthalten waren, die von mindestens drei verschiedenen HLA-Allelen präsentiert wurden (HLA-A2, -B7, und -A3). Schliesslich führte bei zwei weiteren gesunden Probanden nur IE-1₃₁₃₋₃₂₇ (Peptid 79) zur IFN- γ -Produktion. Für diese Probanden ergab die Vorhersage IE-1₃₁₅₋₃₂₃ (**VLEETSVM^L**) als immunogenes Nonamer, präsentiert von HLA-A2. Diese Sequenz war wiederum die ausschliesslich in Peptid 79 enthaltene, was gut mit der Tatsache übereinstimmte, dass beide Probanden ausschliesslich auf dieses eine Peptid Reaktionen zeigten. Ausserdem war diese Sequenz bereits als HLA-A2-restringiertes Epitop beschrieben worden [41]. Alles in allem zeigte sich damit, dass in der kurzen Sequenz IE-1₃₀₅₋₃₂₇ (23 Aminosäuren) nicht weniger als vier verschiedene CD8⁺ T-Zell-Epitope enthalten waren (vgl. Abbildung 11, S.53). Bei einem gesunden Probanden führte IE-1₃₀₅₋₃₁₉ (Peptid 77) ausserdem noch zu einer CD4⁺ T-Zell-Antwort.

Tabelle 12: Neu identifizierte IE-1- und pp65-Epitope

Nr.	Peptid	AS-Position	Aminosäure-Sequenz	CD4+ oder CD8+ Reaktion	Präsentierendes HLA-Allel
			<u>Immunogenes</u> Nonamer		
1.	62	IE-1 ₂₄₉₋₂₆₃	EIM <u>AYAQKIFKIL</u> DE	CD8+	HLA-A24(9)
2.	28	pp65 ₁₀₉₋₁₂₃	MSIYVY <u>ALPLKMLNI</u>	CD8+	HLA-A2
	29	pp65 ₁₁₃₋₁₂₇	<u>VYALPLKMLNI</u> PSIN	CD8+	HLA-A2
3.	40	pp65 ₁₅₇₋₁₇₁	WQAR <u>LTVSGLAWTRQ</u>	CD8+	HLA-A68(28)
	41	pp65 ₁₆₁₋₁₇₅	<u>LTVSGLAWTRQ</u> QNNQW	CD8+	HLA-A68(28)
4.	56	pp65 ₂₂₁₋₂₃₅	DQYVKVYLESFCEDV	CD4+	unbekannt
	57	pp65 ₂₂₅₋₂₃₉	KVYLESFCEDVPSGK	CD4+	unbekannt
5.	63	pp65 ₂₄₉₋₂₆₃	DVEEDLTMTTRNPQPF	CD4+	unbekannt
6.	66	pp65 ₂₆₁₋₂₇₅	QPFMRPHERNGFTVL	CD4+	HLA-DR13(6; 52)
7.	82	pp65 ₃₂₅₋₃₃₉	QIF <u>LEVQAIRETVEL</u>	CD8+	HLA-B35
	83	pp65 ₃₂₉₋₃₄₃	<u>EVQAIRETVEL</u> RQYD	CD8+	HLA-B35
8.	91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQYSE <u>EHPTFTSQYRI</u>	CD8+	HLA-B35
	92	pp65 ₃₆₅₋₃₇₉	<u>EHPTFTSQYRI</u> QGKL	CD8+	HLA-B35
9.	122	pp65 ₄₈₅₋₄₉₉	PPWQA <u>GILARNL</u> VPM	CD8+	HLA-A1
	123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	A <u>GILARNL</u> VPMVATV	CD8+	HLA-A1
10.	131	pp65 ₅₂₁₋₅₃₅	YR <u>IFAELEGV</u> WQPAA	CD8+	HLA-B51(5)

4.2.3. T-Zell-Epitopkartierungen und Restriktionsanalyse von pp65

T-Zell-Epitop-Kartierungen von pp65 wurden bei 13 herz- und 3 lungentransplantierten Patienten durchgeführt. Dabei wurden 9 verschiedene CD4+ Epitope und 13 verschiedene CD8+ Epitope identifiziert. Darunter waren insgesamt 9 Epitope, die zuvor noch nicht beschrieben worden waren (Tabelle 13, S.56). Die Gesamtanzahl von pp65-Epitopen reichte bei den Patienten von 1 bis 5 (Median: 3), die Anzahl der CD4+ Epitope von 0 bis 3 (Median: 1), ebenso wie die Zahl der CD8+ Epitope (Median: 2). Die Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen betrugen 0.02 % bis 5.83 % der CD4+ T-Zellen (Median: 0.25 %) bzw. 0.02 % bis 10.01 % der CD8+ T-Zellen (Median: 0.80 %). Die dominierende T-Zell-Subpopulation war bei 5 Patienten (31 %) CD4+, bei 11 Patienten (69 %) CD8+. Die Anzahl der CD4+ und CD8+ T-Zell-Epitope sowie die Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen wiesen grosse Unterschiede zwischen den Patienten auf. Tatsächlich hatte jeder der untersuchten Patienten eine individuelle T-Zell-Antwort gegen pp65. Die präsentierenden HLA-Allele und wahrscheinlichen immunogenen Nonamere konnten für die meisten Peptide bestimmt werden. Sie sind den Tabellen 11 und 12 (S.50-52) zu entnehmen.

Wie für IE-1 zeigte sich auch für eine Reihe von pp65-Peptiden, dass sie von mehr als einem HLA-Allel präsentiert sein mussten. pp65₃₆₁₋₃₇₅ (Peptid 91, PQYSEHPTFTSQYRI) beispielsweise führte bei fünf Patienten zu IFN- γ -Produktion. Dieses Peptid enthielt nach [38] ein von HLA-A1 präsentiertes Epitop. In der Patientengruppe, für die pp65-Epitop-Kartierungen durchgeführt

wurden, war HLA-A1 jedoch nur insgesamt vier mal vertreten. Folglich musste dieses Peptid ebenfalls von mehreren HLA-Allelen präsentiert worden sein. Bei zwei HLA-A1-positiven Patienten führte nur pp65₃₆₁₋₃₇₅ (Peptid 91) zu IFN- γ -Produktion. Bei drei weiteren Patienten induzierte Peptid 91 dagegen zusammen mit pp65₃₆₅₋₃₇₉ (Peptid 92, EHPTFSQYRIQGKL) T-Zell-Antworten. Diese drei Patienten waren alle HLA-A1-negativ, hatten dafür aber HLA-B35 gemein. Dies legte den Schluss nahe, dass pp65₃₆₁₋₃₇₅ (Peptid 91) ein HLA-A1-restringiertes immunogenes Nonamer (SEHPTFSQY), vielleicht auch ein Decamer, enthielt, eine Sequenz jedenfalls, die ausschliesslich in diesem Peptid vorkam, während bei den übrigen Patienten ein HLA-B35-restringiertes Nonamer zu T-Zell-Antworten führte, das in beiden Peptiden, 91 und 92, enthalten war (EHPTFSQYR). Ausserdem ist in der Literatur ein von HLA*B3801 präsentiertes immunogenes Peptid mit der Sequenz PTFTSQYRIQGKL beschrieben [35]. Die wahrscheinliche Präsentation mehrerer in einem Pentadecapeptid enthaltener Epitope durch verschiedene HLA-Allele war kein Ausnahmefall; sie wurde für insgesamt 17 Peptide beobachtet (Tabelle 14, S.58). Ähnlich wie für IE-1 zeichneten sich auch in der Primärstruktur von pp65 Gebiete mit auffallender „Epitop-Häufung“ ab. Dies traf besonders für die Aminosäure-Sequenz 485-535 zu (vgl. Abb. 12, S.54). Sechs pp65-Peptide waren ausserdem in der Lage, sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zell-Antworten zu induzieren. Bei drei HLA-A2- und HLA-DR11(5;52)-positiven Patienten (Pt-9, Pt-11, und Pt-43) führte pp65₄₈₉₋₅₀₃ (Peptid 123, AGILRNLVPMVATV) z.B. bei CD4+ und CD8+ T-Zellen zu Reaktionen (ein Beispiel dafür ist in Abbildung 10, S.47 wiedergegeben).

Neben der grossen Heterogenität zwischen den Patienten fielen jedoch auch bestimmte konservierte Muster ins Auge. In einer Gruppe von drei Patienten und zwei gesunden Probanden wurden jeweils gemeinsam die drei CD8+ Epitope pp65₂₆₁₋₂₇₉ (Peptide 66/67), pp65₄₁₃₋₄₃₁ (Peptide 104/105) und pp65₄₈₉₋₅₀₇ (Peptid 124, z.T. mit Peptid 123) identifiziert. Diese Patienten bzw. gesunden Probanden hatten alle die Allele HLA-A2 und HLA-B7 gemein. Ein zweites Beispiel sind die Peptide pp65₁₁₇₋₁₃₅ (Peptide 30/31) und pp65₃₆₁₋₃₇₉ (Peptide 91/92), die bei zwei Patienten CD8+ T-Zell-Antworten auslösten. Für diese Peptide war jeweils HLA-B35 als präsentierendes Allel bestimmt worden. Es war dennoch keineswegs möglich, das Reaktionsmuster auf der Basis des (serologisch bestimmten) HLA-Typs vorherzusagen. So hatten von neun untersuchten HLA-A2-positiven Patienten nur acht T-Zell-Antworten gegen pp65₄₈₉₋₅₀₇, und sogar nur drei der sieben untersuchten HLA-DR11(5;52)-positiven Patienten reagierten auf pp65₃₆₁₋₃₈₃.

Tabelle 13: Peptide, die von mehr als einem HLA-Allel präsentiert wurden.

Peptid	Aminosäure-Position	Aminosäure-Sequenz <u>Immunogene</u> 9-mere	Präsentierende HLA-Allele	Literatur- Angabe
49	IE-1 ₁₉₃₋₂₀₇	ARAKKD <u>ELRRKMMYM</u> ARAKKD <u>ELRRKMMYM</u>	HLA-B8 HLA-B18	[38]
50	IE-1 ₁₉₇₋₂₁₁	KD <u>ELRRKMMYM</u> CYRN KD <u>ELRRKMMYM</u> CYRN	HLA-B8 HLA-B18	[38]
62	IE-1 ₂₄₉₋₂₆₃	EIMAY <u>AQAQKIFKIL</u> DE EIMAY <u>AQAQKIFKIL</u> DE	HLA-A24(9) HLA-A2	
77	IE-1 ₃₀₅₋₃₁₉	LSEF <u>CRVLCCYVLEE</u> LSEF <u>CRVLCCYVLEE</u>	HLA-B7 HLA-A2	
78	IE-1 ₃₀₉₋₃₂₃	<u>CRVLCCYVLEE</u> TSVM <u>CRVLCCYVLEE</u> TSVM CRVLCC <u>YVLEE</u> TSVM	HLA-B7 HLA-A2 HLA-A2, HLA-A3	[38]
79	IE-1 ₃₁₃₋₃₂₇	CC <u>YVLEE</u> TSVM LAKR CC <u>YVLEE</u> TSVM LAKR	HLA-A2; HLA-A3 HLA-A2	[38] [41]
28	pp65 ₁₀₉₋₁₂₃	MSIY <u>VYALPLKML</u> NI MSIYVY <u>ALPLKML</u> NI	HLA-A*2402 HLA-A2	[36]
30	pp65 ₁₁₇₋₁₃₁	PLK <u>MLNIPSIN</u> VHHY PLK <u>MLNIPSIN</u> VHHY	HLA-A*0201 HLA-B35	[40]
47	pp65 ₁₈₅₋₁₉₉	A <u>FVFPTKDVAL</u> RHVV AFV <u>FPTKDVAL</u> RHVV	HLA-B35 HLA-A68(28)	[22]
52	pp65 ₂₀₅₋₂₁₉	VC <u>SMEN</u> TRATKMQVI VC <u>SMEN</u> TRATKMQVI	HLA-A1 HLA-B27	[31]
91	pp65 ₃₆₁₋₃₇₅	PQY <u>SEHPTFTS</u> QYRI PQY <u>SEHPTFTS</u> QYRI	HLA-A1 HLA-B35	[35]
123	pp65 ₄₈₉₋₅₀₃	AGILAR <u>NLVPMVAT</u> V AGILAR <u>NLVPMVAT</u> V	HLA-A1 HLA-A2	[22]
56	pp65 ₂₂₁₋₂₃₅	DQYVKVYLESFCEDEV DQYVKVYLESFCEDEV	unbekannt unbekannt	
71	pp65 ₂₈₁₋₂₉₅	IIKPGKISHIMLDVA IIKPGKISHIMLDVA	HLA-DR4(53) unbekannt	[32]
72	pp65 ₂₈₅₋₂₉₉	GKISHIMLDVAFTSH GKISHIMLDVAFTSH	HLA-DR4(53) unbekannt	[32]
128	pp65 ₅₀₉₋₅₂₃	KYQEFFWDANDIYRI KYQEFFWDANDIYRI	HLA-DR3(52) unbekannt	[32]
129	pp65 ₅₁₃₋₅₂₇	FFWDANDIYRIFAEL FFWDANDIYRIFAEL	HLA-DR3(52) unbekannt	[32]

4.2.4. Untersuchung der Klonalität Peptid-spezifischer CD8+ T-Zell-Reaktionen

Einzelne Peptide führten zur Stimulation von bis zu 10 % der CD8+ T-Zellen und mehr. Die Klonalität solch starker CD8+ T-Zell-Reaktionen auf einzelne IE-1 und pp65-Peptide wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen untersucht: zum einen wurden die V β -Familie(n) der reagierenden T-Zell-Population identifiziert (V β -Typisierung). Zusätzlich wurde die T-Zell-Rezeptor-Klonalität von hoch gereinigten, Peptid-spezifischen T-Zell-Populationen mit Hilfe einer TCR- γ 1/2-PCR analysiert. Das Repertoire verfügbarer anti-V β -mAk umfasst derzeit 24 V β -Familien

und Subfamilien. Um die Anzahl der für die V β -Typisierung benötigten Proben zu reduzieren, wurden jeweils ein FITC-konjugierter und ein PE-konjugierter anti-V β -mAk in einem Ansatz kombiniert (z.B. anti-V β 1-PE und anti-V β 2-FITC). Zusammen mit einer unstimulierten und einer stimulierten, mit anti-Pan α / β -mAk gefärbten, Probe konnte die Anzahl benötigter Tests von 26 auf 14 gesenkt werden. Dies entsprach ca. 14×10^6 Zellen, die für diesen Versuch benötigt wurden. Da die T-Zell-Aktivierung häufig eine deutliche Herabregulierung des CD3/TCR-Komplexes zur Folge hat (vgl. Abb. 4, S.30), wurden die V β -Ketten zeitgleich mit der Zugabe des jeweiligen Peptids gefärbt, entsprechend einem Protokoll, welches zur Färbung mit Tetrameren etabliert worden war. Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch unbefriedigend. Nur bei einem einzigen von sechs Patienten konnten die V β -Familien der Peptid-spezifischen T-Zellen direkt bestimmt werden, und in diesem Fall leider auch nur unvollständig (Abb. 13, S.61). Bei diesem Patienten deckten die anti-V β -mAk lediglich 43.14 % des gesamten TCR-V β -Repertoires ab, (ersichtlich aus dem Vergleich der Summe aller V β -positiven T-Zellen mit der gesamten Pan α / β -T-Zell-Population) und die V β -Familien von lediglich 66 % der Peptid-spezifischen T-Zell-Population konnten direkt bestimmt werden. Die Reaktion war auf insgesamt 8 verschiedene V β -Familien verteilt; ca. 50 % der T-Zell-Antwort erschien dabei in den beiden V β -Familien V β 3 und V β 14. Die V β -Familien der übrigen 34 % der Reaktion konnten mit den verfügbaren anti-V β -mAk offensichtlich nicht erfasst werden. Dies war wahrscheinlich bei den übrigen Patienten, bei denen die Typisierung der T-Zell-Antwort nicht gelang, ebenfalls der Fall.

Im Gegensatz dazu bewies die TCR- γ 1/2-PCR eine ausgesprochen hohe Sensitivität. Die TCR- γ 1/2-PCR mit anschließender Analyse fluoreszenzmarkierter PCR-Amplifikate (FFA) wird als ein relativ unkompliziertes Verfahren z.B. bei der Diagnose kutaner T-Zell-Lymphome eingesetzt. Die Methode basiert auf der Detektion klonal expandierter rearrangierter γ -T-Zell-Rezeptoren und kann ebenso für die Untersuchung fixierter Hautbiopsate wie für aus peripherem Blut isolierte PBMC angewendet werden [71]. Wichtig ist aber v.a., dass mit dieser Methode für den Nachweis klonal expandierter T-Zell-Populationen nur eine kleine Zellzahl benötigt wird. Da durch die durchflusszytometrische Nachsortierung die genaue Zellzahl der gereinigten T-Zell-Populationen bekannt war, konnte das Minimum benötigter Zellen für eine erfolgreiche PCR-Analyse im hier vorgestellten Versuchsaufbau mit etwa 1.0×10^3 bestimmt werden. Ein Beispiel für die Isolierung einer Peptid-spezifischen T-Zell-Population ist in Abbildung 14 (S.62) wiedergegeben. Die Ergebnisse der TCR- γ 1- und - γ 2-PCR sind in Abbildung 15 (S.63) dargestellt. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Weekes und Mitarbeitern [23] zeigte sich auch in

den hier untersuchten Reaktionen die Fokussierung der CD8⁺ T-Zell-Antwort auf einige wenige oder nur einen einzigen Klon; keine der untersuchten Reaktionen war polyklonal.

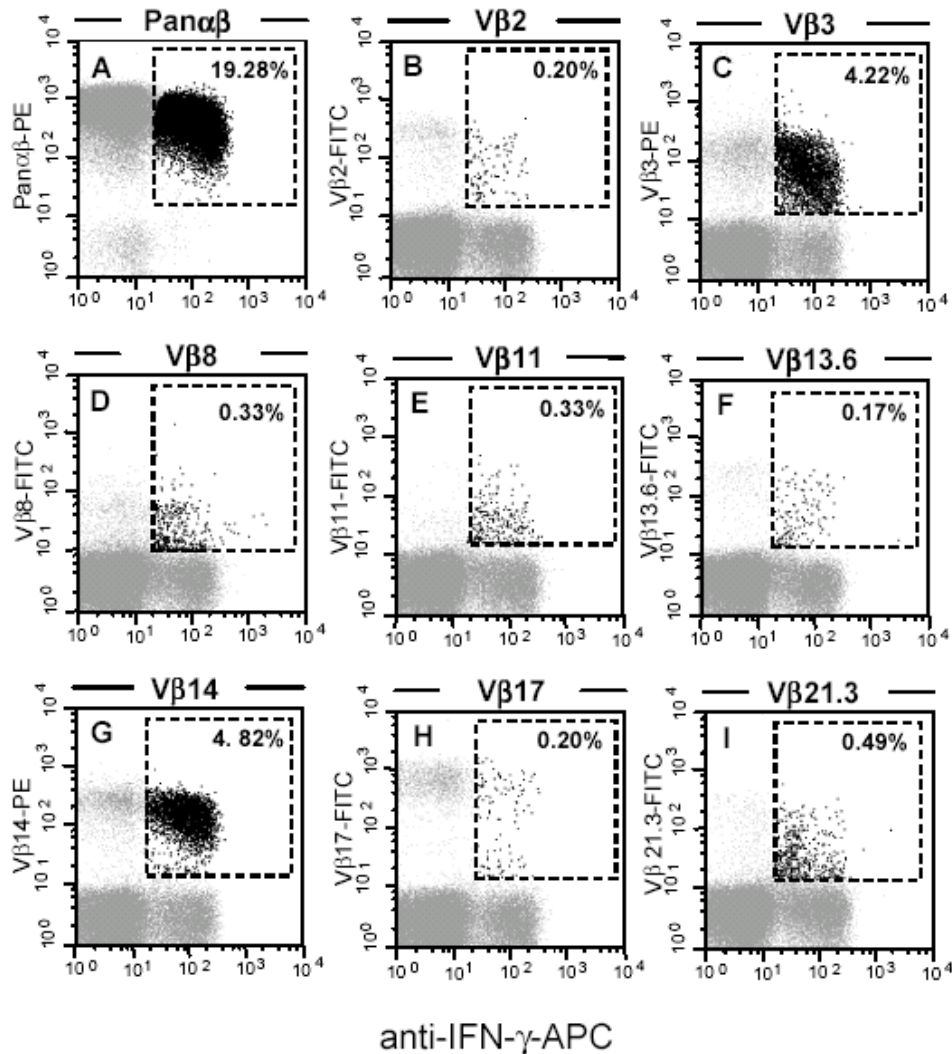


Abbildung 13 Beispiel einer V β -Typisierung einer Peptid-spezifischen T-Zell-Reaktion. PBMC eines herztransplantierten Patienten (Pt-7) wurden für 6 h mit 1 μ g/ml IE-1₃₀₅₋₃₁₉ (Peptid 77) stimuliert. Die Färbung der V β -Ketten erfolgte simultan mit der Antigen-Zugabe. Die Dot Plots zeigen jeweils 100.000 T-Zellen. Die Frequenzen CD8⁺/IFN- γ ⁺/V β ⁺ T-Zellen sind in der rechten oberen Ecke angegeben. Ca. 19 % der CD8⁺ T-Zellen reagierten in diesem Fall auf Stimulation mit diesem Pentadecapeptid mit einer IFN- γ Produktion. Diese Population bestand ausschliesslich aus $\alpha\beta$ T-Zellen, wie aus (A) zu ersehen ist. Zwei starke T-Zell-Reaktionen, die zusammen etwas weniger als die Hälfte der gesamten Antwort ausmachten, wurden in V β 3 (C) und V β 14 (G) beobachtet. In 6 weiteren V β -Familien wurden ebenfalls Reaktionen festgestellt (B, D, E, F, H und I). Mit dem verfügbaren Repertoire an anti-V β -mAk konnten bei diesem Patienten aber lediglich 43,14 % aller $\alpha\beta$ T-Zellen erfasst und nur 66 % der Reaktion typisiert werden. Bei den übrigen Patienten gelang die V β -Typisierung der reagierenden T-Zell-Population überhaupt nicht.

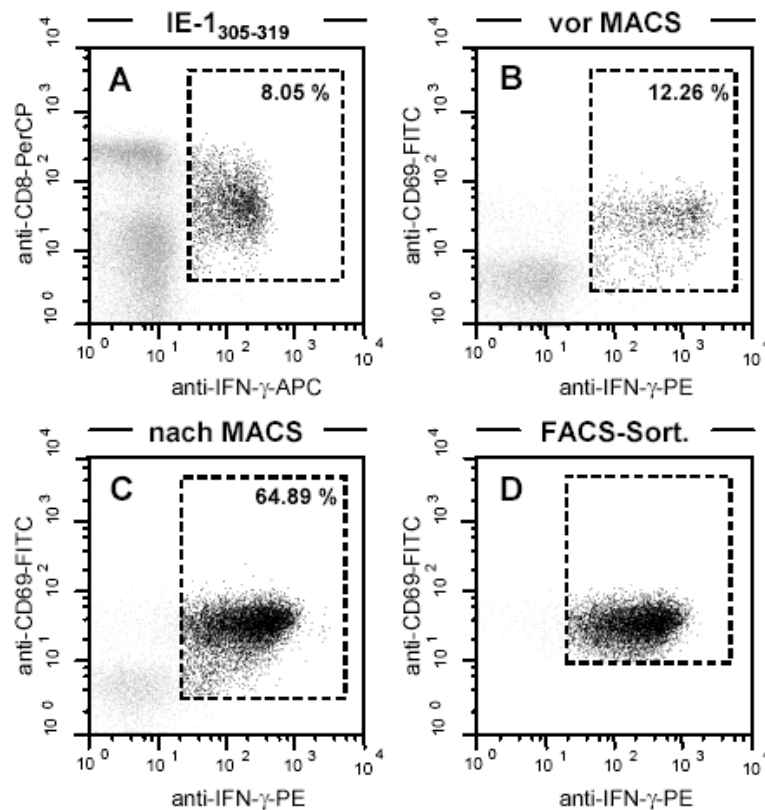


Abbildung 14 Separation einer Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Population für die TCR-γ1/2-PCR am Beispiel von Pt-7. PBMC dieses herztransplantierten Patienten wurden für 6 h mit IE-1₃₀₅₋₃₁₉ (Peptid 77) stimuliert. (A) zeigt die resultierende T-Zell-Reaktion, wie sie sich mittels intrazellulärer Zytokinfärbung darstellte. Anschliessend wurde ein IFN-γ-Sekretions-Assay durchgeführt (B). Durch magnetische Zellseparation (MACS) wurde die reagierende T-Zell-Population (schwarz) angereichert (C). Diese Probe enthielt jedoch noch zu viele nicht der Population zugehörige (T-)Zellen (grau) um eine eindeutige PCR-Analyse zu gewährleisten. Deshalb wurde die T-Zell-Population mit einem FACSDiva durchflusszytometrisch nachsortiert, sodass die Probe nur noch CD8^{high}/CD69⁺/IFN-γ⁺ T-Zellen enthielt („FACS-Sort.“, D).

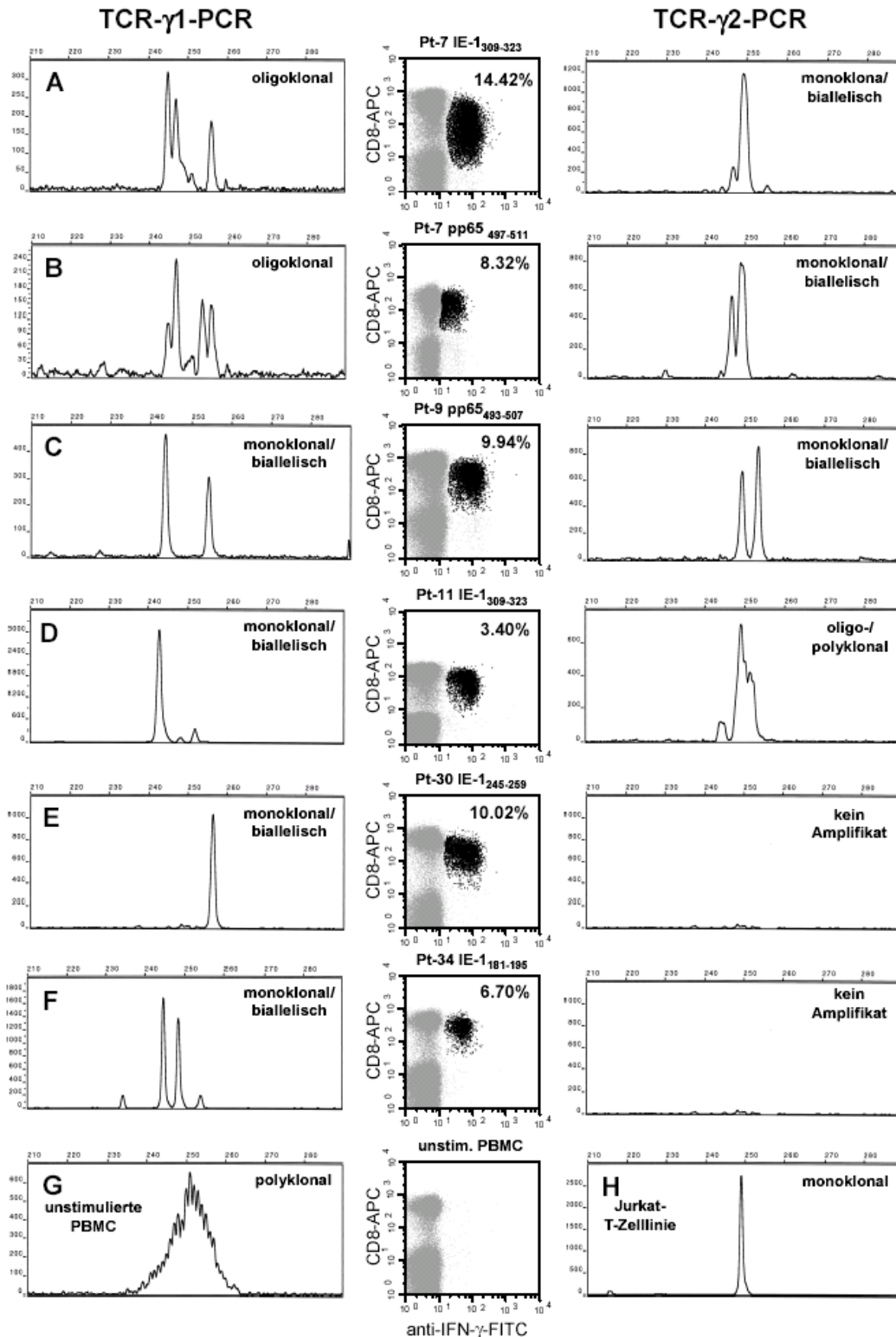


Abbildung 15 Die T-Zell-Antwort gegen einzelne IE-1- und pp65-Pentadecapeptide war auf einige wenige Klone fokussiert. Die T-Zell-Reaktionen (mittlere Spalte in A bis F) wurden zunächst angereichert und dann mit Hilfe zweier verschiedener PCRs auf ihre Klonalität hin analysiert (vgl. Abschnitte 3.3.8 und 3.3.9). Dargestellt ist die Fragmentanalyse fluoreszenzmarkierter PCR-Amplifikate (FFA) der TCR-γ1 und -2-PCR (rechte bzw. linke Spalte) mit der Fragmentlänge („peak size“) auf der Abszisse und der relativen Fluoreszenzintensität auf der Ordinate. Mit TCR-γ1/2-PCR untersuchte Populationen unstimulierter PBMC (G) und einer Jurkat-T-Zelllinie (H) sind als Beispiele einer polyklonalen bzw. monoklonalen T-Zell-Population ebenfalls dargestellt.

4.3. Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung der Patienten

Im letzten Teil der Studie sollte ein erster Versuch unternommen werden, die komplexen Unterschiede in den beobachteten T-Zell-Antworten mit den unterschiedlichen klinischen Verläufen in Beziehung zu setzen. Nach Erhebung der relevanten klinischen Daten wurde dafür zunächst eine Gruppeneinteilung der Patienten nach Ausmaß der HCMV-Reaktivierung in vier Schweregrade vorgenommen (keine, asymptomatische und symptomatische Reaktivierung, invasive HCMV-Erkrankung). Diese Einteilung orientierte sich an den Definitionen der 5. internationalen HCMV-Konferenz, Stockholm, 1995 [75]. Im Verlauf nach Transplantation hatten danach fünf Patienten (25 %) eine manifeste HCMV-Erkrankung (Gruppe 4). In zwei Fällen war die Diagnose biptisch gesichert worden; es handelte sich in beiden Fällen um eine HCMV-Gastritis. Weitere wesentliche Charakteristika der Patientengruppe sind in Tabelle 3 (S.19) aufgeführt. Obwohl die Patientengruppe relativ klein war, wich die Verteilung der HLA-Allele nur in wenigen Fällen um mehr als 5 % von der der Durchschnittsbevölkerung ab (Abb. 3, S.20).

Anschliessend wurden die wesentlichen Prozessvariablen „Anzahl der Epitope“ und „T-Zell-Frequenzen“ mittels Vergleich von Mittelwert und Median, Schiefe der Verteilung, Shapiro-Wilks-Test und Q-Q-Diagramm auf ihre Verteilung untersucht. Diese Analyse ließ den Schluss nicht zu, dass die Variablen normalverteilt waren. Für alle weiteren Untersuchungen wurden demgemäss nicht-parametrische Testverfahren eingesetzt, insbesondere der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient und der zweiseitige Mann-Whithney-U-Test.

Tabelle 14: Gruppeneinteilung der Patienten nach Ausmass der HCMV-Reaktivierung

Gruppe	Definition	Patienten
1	HCMV-seropositiv, keine Antigen-/DNAämie = keine HCMV-Reaktivierung	Pt-2, Pt-9, Pt-10, Pt-11, Pt-31, Pt-34
2	HCMV-seropositiv, symptomlose Antigen-/DNAämie (pp65-Antigenämie ab $\geq 1/200.000$ Zellen positiv) = asymptomatische HCMV-Reaktivierung	Pt-7, Pt-21, Pt-29, Pt-30, Pt-35, Pt-39, Pt-43
3	HCMV-seropositiv, Antigen-/DNAämie, erhöhte Temperatur/Fieber ($> 37,5^{\circ}\text{C}$) und/oder Leukopenie ($< 4 \text{ GPT/l}$) = symptomatische, nicht-invasive HCMV-Reaktivierung	Pt-32, Pt-37
4	HCMV-seropositiv, Antigen-/DNAämie, Fieber und/oder Leukopenie mit Transaminasenanstieg, Diarrhoe, oder biptisch gesicherter HCMV-Organmanifestation inkl. positiver BAL = invasive HCMV-Erkrankung	Pt-15, Pt-18, Pt-19, Pt-24, Pt-40

Zu den bearbeiteten Fragestellungen gehörte in erster Linie die Korrelation des Ausmasses an HCMV-Reaktivierung und der Anzahl der HCMV-Reaktivierungen mit einer Reihe unterschiedlicher Parameter wie der Anzahl der CD4+ bzw. CD8+ T-Zell-Epitope in IE-1 und pp65, der dominanten T-Zell-Subpopulation, der Haupt-T-Zell-Zielstruktur (IE-1 oder pp65), dem Lebensalter der Patienten usw. (Tabelle 16). Die durchgeführten Analysen ergaben jedoch für keine der bearbeiteten Fragestellung eine signifikante Korrelation, weshalb die Ergebnisse hier im einzelnen nicht dargestellt sind. Lediglich auf eine interessante Tendenz sei hingewiesen: in der Patienten-Gruppe, in der die IE-1-Antworten dominierten (8 von 20 Patienten), hatte keiner der Patienten eine symptomatische HCMV-Reaktivierung oder erkrankte an HCMV. Der Grossteil der Patienten (5 von 8) befand sich in Gruppe 1; bei ihnen wurde also gar keine Reaktivierung beobachtet. Drei von acht Patienten hatten lediglich Episoden symptomloser Reaktivierung.

Tabelle 15: Explorative Statistik; wichtige Merkmale, die miteinander korreliert wurden

Korrelierte Merkmale	
Ausmass der HCMV-Reaktivierung (vgl. Tab. 15)	Anzahl der IE-1-Epitope
Ausmass der HCMV-Reaktivierung	Anzahl der pp65-Epitope (CD4+, CD8+, insgesamt)
Ausmass der HCMV-Reaktivierung	T-Zell-Antworten auf pp65 bzw. auf IE-1 und pp65
Ausmass der HCMV-Reaktivierung	Dominierende T-Zell-Subpopulation (CD4+/CD8+)
Ausmass der HCMV-Reaktivierung	Lebensalter bei Transplantation
Anzahl der HCMV-Reaktivierungen	Lebensalter bei Transplantation
Lebensalter bei Transplantation	Anzahl der IE-1 bzw. pp65-Epitope

5. Diskussion

5.1.1. *Die T-Zell-Antwort gegen IE-1 und pp65 ist komplex strukturiert*

Wie in der Einleitung erwähnt, zeichnet sich zunehmend die Komplexität der T-Zell-Antwort gegen HCMV ab. Sie findet ihren Ausdruck z.B. in unterschiedlichen Effektorfunktionen [44, 45] oder Oberflächen-Phänotypen von CD8⁺ T-Zellen [43]. Im Rahmen der methodischen Versuche zeigte sich, wie unterschiedlich die Dosis-Wirkungsbeziehungen für verschiedene Antigene und zwischen verschiedenen Probanden sein können. In der untersuchten Patientengruppe beobachteten wir zudem grosse intraindividuelle und interindividuelle Unterschiede hinsichtlich des immundominanten Proteins, der gemessenen Peptid-spezifischen T-Zell-Frequenzen, der Anzahl der identifizierten pp65-Epitope, der dominierenden T-Zell-Subpopulation sowie der präsentierenden HLA-Allele. Im folgenden Abschnitt 5.1 werden zunächst die Ergebnisse der methodischen Arbeiten diskutiert. Im Abschnitt 5.2 sollen einzelne Aspekte der komplexen T-Zell-Antwort gegen HCMV eingehender beleuchtet werden, bevor in Abschnitt 5.3 schliesslich deren klinische Implikationen diskutiert werden.

5.2. Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der methodischen Arbeiten

5.2.1. *Ein definitives Versuchsprotokoll für die intrazelluläre Zytokinfärbung*

1995 wurde von Picker und Mitarbeitern eine Methode vorgestellt, die es ermöglichte, Antigen-spezifische T-Zellen nach Kurzzeitstimulation *ex vivo* (6 bis 8 h) durch die Färbung intrazellulär zurückgehaltener Zytokine durchflusszytometrisch zu charakterisieren und direkt zu quantifizieren [63]. Die Färbung von IFN- γ als wichtigem und rasch induzierbaren Effektorzytokin war dazu besonders geeignet. Dieses Verfahren erwies sich als wertvolle Innovation. Von der Einführung eines Vollblut-Protokolls bald darauf versprach man sich eine entscheidende Vereinfachung dieser Methode [72]. Dadurch entfiel nicht nur die aufwendige und zudem schwierig zu standardisierende Präparation von PBMC. Im direkten Vergleich wurden im Vollblut sogar leicht höhere T-Zell-Frequenzen auf Stimulation mit viralem Lysat und Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) bei gleicher Antigenkonzentration gemessen als in PBMC. Dies wurde damit erklärt, dass Vollblut ein „physiologischeres Milieu“ für die Kurzzeitstimulation darstellt als PBMC [72]. Nomura und Mitarbeiter bemühten sich dann um „Optimierung“ dieses Protokolls; u.a. gaben sie als effektivste Antigenkonzentration für HCMV-Lysat 5 μ g/ml an [73]. Die Präparation von PBMC

stellt unzweifelhaft einen Arbeitsaufwand dar, der durch die Verwendung von Vollblut entfällt. Fragwürdig war für uns dagegen, ob Vollblut wirklich das „physiologischere“ Milieu darstellt. Die Präsentation von Antigenen und deren Erkennung durch T-Zellen erfolgen in sekundären lymphatischen Organen und peripheren Geweben - nicht im Vollblut. Tatsächlich könnte gerade die Anwesenheit bestimmter Plasmafaktoren im Vollblut (Proteasen und andere Proteine), die weder in peripheren Geweben noch in PBMC-Suspensionen vorhanden sind, mit der Aufnahme und Präsentation von Antigenen interferieren. Solche Plasmafaktoren sind noch viel weniger zu standardisieren als die PBMC-Präparation. Hinzu kommt, dass gerade mit PBMC exakte - standardisierte - Zellkonzentrationen eingestellt werden können, was bei Vollblut-Proben schwierig ist. Von diesem Standpunkt aus betrachtet spricht also eher wenig für die Verwendung von Vollblut.

Wir entschieden uns deshalb, mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven für Antigene, die häufig im Rahmen dieser Methode verwendet werden (Nona- und Pentadecapeptide sowie virales Lysat), Vollblut- und PBMC-Versuchsaufbau nochmals systematisch zu vergleichen. Vorrangiges Ziel war, festzustellen, ob Vollblut als Milieu tatsächlich besser geeignet ist. Die signifikanten Unterschiede, die sich in allen vergleichenden Experimenten ergaben (einschliesslich der im Antikoagulanzenvergleich beobachteten Differenzen), sprachen dabei jedoch eindeutig für die Verwendung von PBMC. Neben den deutlich höheren maximalen T-Zell-Frequenzen waren diese v.a. schon bei sehr viel kleineren Antigenkonzentrationen durchflusszytometrisch detektierbar als im Vollblut. Beides war von Bedeutung für die Sensitivität der Methode. Ausserdem hatte die Wahl des Antikoagulanzen offensichtlich keinen wesentlichen Einfluss auf den PBMC-Versuchsaufbau. Aus der Summe dieser Betrachtungen heraus entschieden wir uns, für alle weiteren Versuche mit *ex vivo* Kurzzeit-Stimulation und anschliessender intrazellulärer Zytokinfärbung PBMC zu verwenden.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigten aber noch etwas anderes: die nach Stimulation mit einzelnen Peptiden gemessenen T-Zell-Antworten wiesen grosse interindividuelle Unterschiede auf, so gross, dass die Festlegung einer einheitlichen, als „optimal“ zu bezeichnenden Peptidkonzentration im Prinzip nicht möglich war. Die ausgeprägte - und zudem sehr individuelle - Abhängigkeit der T-Zell-Frequenz von der eingesetzten Antigenkonzentration hatte noch eine weitere Implikation: solange nicht die konkrete Dosis-Wirkungsbeziehung des jeweiligen Antigens bei einem bestimmten Patienten oder Probanden bekannt ist und nicht bekannt ist, ob diese über die Zeit stabil ist, bleibt ungewiss, ob sich dessen T-Zell-Antwort bei einer gegebenen Antigenkonzentration nahe ihres Maximums befindet oder weit davon entfernt. Dieser Faktor sollte beim Ver-

gleich von T-Zell-Frequenzen zwischen verschiedenen Patienten oder Probanden Berücksichtigung finden. Weiter ist zu beachten, dass die intrazelluläre Zytokinfärbung im Unterschied zur Tetramer-Technik nur die Quantifizierung funktioneller, innerhalb relativ kurzer Zeit mit einer Zytokin-Produktion reagierender, Antigen-spezifischer T-Zellen erlaubt. Da eine grosse Menge Peptide für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt werden sollte, musste ein sinnvoller Kompromiss zwischen Aufwand und Effektivität gefunden werden. Die T-Zell-Antworten mussten dabei nicht notwendigerweise im Bereich ihres Maximums liegen (denn die Epitop-Kartierung hat v.a. qualitativen Charakter), sollten von ihrer Grössenordnung her mit dieser Konzentration aber zumindest deutlich in messbaren Bereichen sein. Eine Dosis von 1 µg/ml erschien dafür auf der Basis der Dosis-Wirkungs-Kurven geeignet. Der Zusatz exogener Kostimulation hätte die Sensitivität der Methode zudem möglicherweise noch erhöhen können. Die Verwendung kostimulatorischer monoklonaler Antikörper gegen CD28 und CD49d ist in zahlreichen Arbeitsgruppen integraler Bestandteil des Versuchsaufbaus [66, 72, 73]. Die Ergebnisse unserer Versuche zeigten jedoch nur einen sehr geringen Effekt auf die Kurzzeitstimulation mit einzelnen Pentadecapeptiden bei transplantierten Patienten. Weil die Verwendung solcher Antikörper einen zusätzlichen Aufwand an Zeit, Arbeit und Kosten bedeutet, ausserdem eine weitere artifizielle Komponente in den Versuchsaufbau einführt und vereinzelt sogar stärkere T-Zell-Antworten ohne Kostimulation beobachtet wurden als mit, entschieden wir uns, auf den Zusatz von anti-CD28 und anti-CD49d zu verzichten. Desweiteren hatten sich Isotyp-Kontrollen im vorangegangenen Projekt als für diesen Versuchsaufbau unnötig herausgestellt. Da auch Positiv-Kontrollen mit PMA/Ionomycin aus den im Ergebnissteil dargelegten Gründen keinen nennenswerten Informationsgewinn erbringen, wurde auf die Durchführung dieser Kontrollen ebenfalls verzichtet. Für methodische Untersuchungen, insbesondere solche, in denen T-Zell-Frequenzen direkt miteinander verglichen werden sollen, ist die Durchführung von Dreifachansätzen ratsam. Für die T-Zell-Epitopkartierung waren aber aufgrund des begrenzten Patienten-Materials Doppel- oder gar Dreifachbestimmungen nicht machbar. Wir entschieden uns deshalb für die T-Zell-Epitop-Kartierung und alle anderen Versuche mit intrazellulärer Zytokinfärbung für folgendes Versuchsprotokoll: aus Citratblut isolierte PBMC wurden über Nacht im Brutschrank vorinkubiert, bevor sie am darauffolgenden Tag in Einzelansätzen mit Pentadecapeptiden in einer Endkonzentration von je 1 µg/ml für 6 h ohne Zusatz exogener Kostimulation stimuliert wurden. Als Kontrolle diente dabei ausschliesslich eine mit 4 µl DMSO stimulierte (entsprechend der DMSO-Menge in den zugegeben Peptid-Lösungen) und mit anti-IFN-γ-FITC gefärbte Probe. Zudem wurde immer auch eine „Gesamtmischung“ des entsprechenden Proteins mitgeführt.

5.2.2. *T-Zell-Epitop-Kartierung mit dem neuem Peptidpool-Design*

Das dreidimensionale Peptidpool-Design wurde entworfen, um die Anzahl der für eine T-Zell-Epitop-Kartierung benötigten Proben so weit zu reduzieren, dass auch die Untersuchung von Patienten möglich wurde. Die Effektivität dieses neuen Verfahrens hing wesentlich von zwei Faktoren ab: (1) der Anzahl an PBMC, die pro Untersuchungstermin insgesamt zur Verfügung standen und (2) der Anzahl der Peptide, die nachgetestet werden mussten. Bei einem Protein wie IE-1, in dem bei Patienten oder Probanden nur selten mehr als zwei Epitope identifiziert wurden, erwies sich die neue Methode als deutlich effektiver als die bisher eingesetzte. Mit steigender Anzahl an Peptiden, die zu IFN- γ -Produktion führten, nahm die Effizienz allerdings ab. Bei ≥ 5 Epitopen beispielsweise (wie bei Pt-9, vgl. Abb. 10, S.47), erwies sich die Identifizierung der Epitope nicht nur als eine Herausforderung. Weil in jedem Pool deutlich mehr Peptide enthalten waren als beim zweidimensionalen Pool-Design (bis zu 30 anstatt 12), blieben auch entsprechend mehr Peptide als potentielle Kandidaten zur Nachtestung übrig. Diese wurden in solchen Fällen wieder entsprechend einer zweidimensionalen Matrix kombiniert, um die Anzahl der Tests zu reduzieren. Bei Pt-9 war die Anzahl benötigter Proben für die Epitop-Kartierung inkl. Nachtestung am Ende dennoch identisch mit der, die mit dem zweidimensionalen Peptidpool-Design benötigt worden wäre. Dieser Fall blieb jedoch die Ausnahme; fünf Epitope wurden nur bei diesem Patienten beobachtet. Bei nicht lymphopenischen Patienten konnte die komplette Epitop-Kartierung in einem Grossteil der Fälle zu einem einzigen Zeitpunkt aus den ca. 16 ml Vollblut erfolgen, die vom DHZB bei jedem Ambulanztermin eines Patienten zur Verfügung gestellt wurden. Damit war der Langzeitverlauf der T-Zell-Antwort auf Epitop-Ebene nach initialer Epitop-Kartierung auf der Basis dieser Technik möglich geworden und wurde im Anschluss an dieses Projekt bereits an weiteren herz- und lungentransplantierten Patienten umgesetzt. Im Vergleich zu der schon erwähnten Arbeit von Hebart und Mitarbeitern [47] hat dieser Ansatz v.a. den Vorteil, dass wahrscheinlich die gesamte T-Zell-Antwort gegen ein Protein und nicht nur eine ausgewählte antigene Determinante verfolgt wird. Warum nur „wahrscheinlich“ die gesamte T-Zell-Antwort? Weil die untere Nachweisgrenze der Methode bei Frequenzen von 1 bis 2 IFN- γ -positiven Zellen pro 10.000 (0.01 % bis 0.02 %) der entsprechenden T-Zellsubpopulation liegt, vorausgesetzt, der Background (Hintergrundrauschen) in den Proben ist sehr niedrig (< 0.02 %). Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, dass ein Patient über Epitop-spezifische T-Zellen verfügt, die (zeitweise) unter der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze liegen. Tatsächlich konnten wir solche nur zeitweise detektierbaren Reaktionen beobachten (s.u.). Das neue Peptidpool-Design könnte auch als ein Modell für die Identifizierung von T-Zell-Epitopen in anderen immu-

nogenen Proteinen von HCMV, beispielsweise pp150 oder pp28, wie auch in anderen Pathogenen (HIV, HBV und HCV, Tuberkulose usw.) dienen.

5.2.3. *Weitere methodische Arbeiten*

Zunächst testeten wir den IFN- γ -Sekretions-Assay mit nachfolgender magnetischer Zellseparation nach Stimulation mit einzelnen IE-1 und pp65-Pentadecapeptiden mit PBMC gesunder Probanden. Die Klonalität einer auf diese Weise gereinigten Peptid-spezifischen T-Zell-Population von Pr-6 wurde dann mit der TCR- γ 1/2-PCR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass durch magnetische Zellseparation allein eine ausreichende Reinheit der Probe für eine sichere Beurteilung der Klonalität nicht gewährleistet werden konnte; die Probe enthielt noch zuviele (T-)Zellen, die nicht der Peptid-spezifischen Population angehörten (vgl. Abb. 14, S.62). Deshalb entschieden wir uns, nach der magnetischen Zellseparation eine durchflusszytometrische Feinsortierung der CD8^{pos}/CD69^{high}/IFN^{pos} T-Zellen anzuschliessen, um so sicherzustellen, dass die Probe ausschliesslich Peptid-spezifische T-Zellen enthielt. Die damit gewonnenen Zell-Populationen waren zwar sehr rein, bestanden aber nur noch aus wenigen Zellen. Der hohen Sensitivität der TCR- γ 1/2-PCR war es zu verdanken, dass die Klonalitätsanalyse dennoch in sechs von sieben Fällen erfolgreich verlief. Die Untersuchung der T-Zell-Rezeptorklonalität durch die in dieser Arbeit vorgestellte Methode bietet im Vergleich zu den bisher angewendeten Verfahren [23, 24, 25, 26] einige Vorteile: (1) die T-Zell-Antwort auf jedes beliebige immunogene Peptid kann, unabhängig von der Kenntnis des präsentierenden HLA-Allels, untersucht werden. (2) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Reaktionen können analysiert und Peptid-spezifische T-Zell-Frequenzen direkt ermittelt werden. (3) Der Versuchsaufbau ist vergleichsweise einfach und nimmt nur einen einzigen Tag in Anspruch. (4) Der methodische Fehler wird dadurch, v.a. aber durch Vermeidung langer *in vitro* Zell-Kulturen sowie durch die direkte Isolierung der T-Zell-Population aus Material des Patienten oder Probanden, minimiert. Man untersucht so gewissermassen den „Wildtyp“ der Reaktion. (5) Für die Untersuchung werden nur sehr kleine Mengen Vollblut benötigt (in unseren Versuchen reichten etwa 10 ml aus). Damit können diese Versuche mit Patienten-Material erfolgen, wenn gewünscht auch im Langzeitverlauf. Umgekehrt können auch sehr schwache T-Zell-Reaktionen untersucht werden; die Menge des zur Verfügung stehenden Materials muss dafür entsprechend erhöht werden. Die Bestimmung der V β -Familien der reagierenden T-Zellen erachten wir dagegen als wenig sinnvoll. Das Repertoire der zur Verfügung stehenden anti-V β -mAk ist derzeit noch zu unvollständig, um eine umfassende und detaillierte Analyse gewährleisten zu können.

5.3. Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen von T-Zell-Epitop-Kartierung und Untersuchungen zur T-Zell-Klonalität

5.3.1. Bedeutung Peptid-spezifischer T-Zell-Frequenzen

Die Spannweite der beobachteten T-Zell-Frequenzen war ausserordentlich gross. Wir konnten T-Zell-Reaktionen beobachten, die zeitweise unter, zeitweise knapp über der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze lagen. Ein Beispiel dafür sind die Peptide pp65₂₈₁₋₂₉₅ und pp65₂₈₅₋₂₉₉ (Peptide 71 und 72), auf die Pt-7 sehr schwache CD4⁺ T-Zell-Reaktionen zeigte. Ebenso schwach war seine CD8⁺ T-Zell-Antwort auf pp65₄₈₉₋₅₀₃ (Peptid 123); erst bei mehrfacher Nachtestung konnte eine Reaktion von 0.03 % der CD8⁺ T-Zellen auf dieses Peptid festgestellt werden. Das war insofern erstaunlich, weil das angrenzende pp65₄₉₃₋₅₀₇ (Peptid 124) die stärkste pp65-spezifische T-Zell-Antwort bei Pt-7 induzierte. Beide Peptide enthielten das von HLA-A2 präsentierte Nonamer **NLVPMVATV**. Pt-7 hatte mit zuletzt 27 % der CD8⁺ T-Zellen auf IE-1₃₀₅₋₃₁₉ (Peptid 77) auch die größte in der gesamten Gruppe gemessene T-Zell-Antwort (vgl. Tabelle 10, S.50).

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war, mit sehr wenig Material die T-Zell-Antwort auf ein Ziel-Protein, repräsentiert in Form der jeweiligen „Gesamtmischung“, in ihre einzelnen Epitope aufschlüsseln zu können, um die Weiterverfolgung dieser Antwort auf Ebene der einzelnen CD4⁺ und CD8⁺ Epitope möglich zu machen. Im Zusammenhang mit den Dosis-Wirkungskurven wurde schon angedeutet, dass dabei unbekannt ist, ob die auf ein bestimmtes Peptid gemessene T-Zell-Antwort mit der eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml sich nahe ihres Maximums befindet oder weit davon entfernt. Hinzu kommt, dass sich über den Zeitverlauf z.T. extreme Schwankungen der T-Zell-Frequenzen beobachten lassen.

Abbildung 5-1 (Abb. 16, S.72) illustriert das anhand von drei zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen CD8⁺ T-Zell-Reaktionen auf die bei Pt-7 dominanten Peptide in IE-1 und pp65. Theoretisch ist auch nicht sicher auszuschliessen, dass sich die Dosis-Wirkungsbeziehung für ein Peptid im Zeitverlauf ändert. Schliesslich muß noch berücksichtigt werden, dass lediglich die Frequenzen Antigen-spezifischer T-Zellen im Blut bestimmt werden, nicht aber in sekundären lymphatischen Geweben oder in peripheren Geweben, in den Kompartimenten also, in denen die Immun- Antwort eigentlich stattfindet. Die Quantifizierung HCMV-spezifischer T-Zellen ist essentieller Bestandteil des angestrebten Monitorings der antiviralen T-Zell-Antwort. Die dargelegten Faktoren komplizieren die schwierige Interpretation der klinischen Bedeutung der gemessenen T- Zell-Frequenzen aber noch zusätzlich.

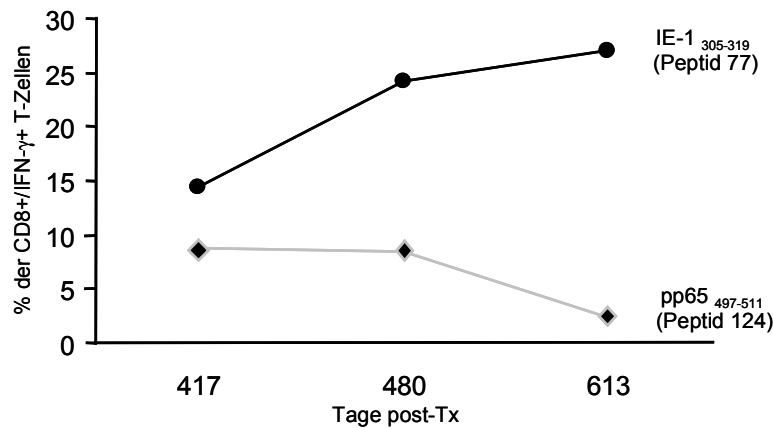


Abbildung 16 Verlauf HCMV-spezifischer T-Zell-Frequenzen auf Epitop-Ebene. Dargestellt sind zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation gemessene CD8+ T-Zell-Reaktionen auf einzelne Peptide, die die bei Pt-7 dominanten Epitope in IE-1 und pp65 enthielten.

5.3.2. Bedeutung des immundominanten Proteins

In der untersuchten Gruppe gab es Patienten, die ausschliesslich eine T-Zell-Antwort auf pp65 zeigten und solche, die auf beide Proteine reagierten; dabei stand, zumindest gemessen an der Frequenz Antigen-spezifischer T-Zellen, zumeist ein Protein deutlich im Vordergrund (vgl. Tab. 9, S.48). Pt-39 beispielsweise hatte eine starke IE-1-spezifische T-Zell-Antwort; die Reaktion auf pp65 war kaum messbar. Bei anderen Patienten, wie z.B. bei Pt-15, war die IE-1-Antwort sehr schwach ausgeprägt; hier schien pp65 deutlich stärker zu stimulieren. Nur wenige Patienten hatten in etwa vergleichbar starke T-Zell-Antworten auf beide Proteine. Von beiden Proteinen wird angenommen, dass sie bedeutende, wenn nicht die beiden wichtigsten, Zielstrukturen in HCMV sind [37]. Warum so deutliche „Präferenzen“ für das eine oder das andere Protein beobachtet werden, ist unklar. Über das Ausmass der Immunogenität beider Proteine wird zudem kontrovers diskutiert. Einen Überblick zu diesem Thema gibt eine Übersichtsarbeit von Reddehase [37]. Träfe es tatsächlich zu, dass pp65 die proteasomale Prozessierung von IE-1 zu verhindern vermag, würden IE-1-Peptide nur bei nicht vorhandener UL83-Genexpression, also z.B. in der IE-Phase der Reaktivierung aus der Latenz, auf der Zell-Oberfläche präsentiert. Welche klinische Bedeutung das haben könnte, wird in Abschnitt 5.3 diskutiert.

5.3.3. Anzahl der identifizierten Epitope und Subpopulationen der Epitop-spezifischen T-Zellen

Auch in diesen beiden Aspekten zeigte die T-Zell-Antwort grosse Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten. Bei einigen war die pp65-Antwort fokussiert auf ein einziges CD8+ Epitop. Pt-24 beispielsweise reagierte nicht auf IE-1 und hatte nur eine relativ schwache CD8+ T-

Zell-Antwort gegen pp65₁₈₅₋₁₉₉ (Peptid 47). Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen von Wills und Mitarbeitern, die als erste die starke Fokussierung der T-Zell-Antwort gegen HCMV auf wenige oder nur ein einzelnes pp65-Epitop beschrieben [22]. Zudem ergab die Untersuchung der Klonalität ausgewählter starker CD8⁺ T-Zell-Reaktionen eine deutliche Fokussierung der Antwort auf einen oder wenige T-Zell-Klone, wie sie zuvor schon von Weekes und Mitarbeitern beobachtet worden war [23]. Ein gutes Beispiel dafür ist die T-Zell-Reaktion von Pt-30 auf IE-1₂₄₅₋₂₅₉ (Peptid 62), die aus einem einzigen Klon bestand (vgl. Abb. 15, S.63). Bei keinem der untersuchten Patienten wies die T-Zell-Antwort eine polyklonale Struktur auf. Weekes und Mitarbeiter führten das unter anderem auf die wiederholte Auseinandersetzung mit viralen Antigenen im Rahmen von Reaktivierungen von HCMV zurück, die mit der Zeit einerseits zur Selektion von T-Zellen mit hochaffinen T-Zell-Rezeptoren und andererseits zu hohen Frequenzen dieser Antigen-spezifischen T-Zellen führe [23], ein Phänomen, das auch schon für andere persistierende Virusinfektionen wie EBV, HIV-1 und HTLV-1 beschrieben worden war [76, 77, 78]. Dass bei anderen Patienten hingegen Reaktionen gegen eine Reihe verschiedener Epitope beobachtet wird, war ebenfalls schon von Wills und Mitarbeitern beschrieben worden [22]. Bei Pt-9 beispielsweise führten fünf Epitope zu z.T. starken Reaktionen in der CD8⁺ und in der CD4⁺ T-Zell-Subpopulation, im Falle der Peptide 123 und 124 sogar in beiden Subpopulationen, ein Phänomen, das bisher noch nicht beschrieben worden war (vgl. Abb. 10, S.47). Die in der Stichprobe identifizierten CD4⁺ T-Zell-Epitope konnten dabei in einem, zwei oder drei Pentadecapeptiden enthalten sein, was auf sehr unterschiedliche Bindungsmotive schliessen lässt. Die IE-1-spezifische T-Zell-Antwort war demgegenüber in der hier untersuchten Gruppe deutlich stärker fokussiert. Im Median erkannten die Patienten nur ein Epitop in IE-1.

5.3.4. Bedeutung des HLA-Typs für die Reaktivität

Determiniert der HLA-Typ des Patienten seine HCMV-spezifische Reaktivität? Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen diesen Schluss nicht zu und bestätigen damit die von Betts und Mitarbeitern gemachten Beobachtungen [79]. Eine Reihe von Patienten zeigte nicht die auf der Grundlage ihres HLA-Typs zu erwartenden Reaktionen auf bestimmte Peptide, eine Tatsache, für die es mehrere Erklärungen gibt. So war Pt-32 beispielsweise der einzige von neun untersuchten HLA-A2-positiven Patienten, der keine T-Zell-Reaktion auf die pp65-Peptide 123 und 124 zeigte. Das HLA-A2-Allel umfasst mindestens 25 molekularbiologisch unterscheidbare Subspezifitäten [80]. Möglicherweise verfügte Pt-32 nicht über die Subspezifität HLA-A*0201, sondern z.B. über HLA-A*0224. Diese Frage könnte leicht durch eine molekularbiologische Typisierung der HLA-

Typen beantwortet werden. Doch auch HLA-A*0201-positive Probanden reagieren nicht immer auf NLVPMVATV - in einer Arbeit von Longmate und Mitarbeitern hatten aber immerhin 28 von 30 HLA-A*0201-positiven Probanden (93 %) messbare T-Zell-Reaktionen auf dieses Peptid („Chromium release assay“) [35]. Dieser Prozentsatz ähnelt dem in dieser Arbeit beobachteten von 88 %. Natürlich spielt die Sensitivität der Messmethode ebenfalls eine Rolle. Möglicherweise lag die Frequenz der für NLVPMVATV spezifischen T-Zellen von Pt-32 zum Zeitpunkt der Epitop-Kartierung einfach unterhalb der durchflusszytometrischen Nachweisgrenze, wie es z.B. bei Pt-7 beobachtet worden war. Zwei weitere Erklärungen für fehlende Reaktivitäten sind im Gegensatz dazu nur schwer zu untersuchen: das T-Zell-Rezeptor-Repertoire, über das ein Patient verfügt sowie der oder die HCMV-Stämme, mit denen er (ko-)infiziert ist. So wäre eine plausible Erklärung dafür, dass Pt-32 nicht auf die pp65-Peptide 123 und 124 reagierte, dass er über keinen passenden T-Zell-Rezeptor verfügte, um NLVPMVATV zu erkennen. Eine weitere Einschränkung der hier erzielten Ergebnisse besteht darin, dass den Versuchen die Aminosäure-Sequenz von IE-1 bzw. pp65 des Laborstamms AD169 zugrunde liegt. Klinische Isolate können von dieser Sequenz mehr oder weniger stark abweichen [51]. Es ist also durchaus denkbar, dass ein Patient T-Zell-Antworten *in vivo* gegen Peptid-Sequenzen hatte, die in unserem *in vitro*-System gar nicht vorkamen und deshalb auch nicht gemessen werden konnten. Es gibt Arbeiten, die sich mit der klinischen Relevanz der Infektion mit verschiedenen Virusstämmen auseinandersetzen. Andere Arbeiten konzentrieren sich auf die Identifizierung von Epitopen in Regionen immunogener Proteine, die hochkonserviert zwischen unterschiedlichen HCMV-Stämmen sind, wie z.B. das Exon4 von IE-1 (Aminosäurereste 86-491) [42].

5.3.5. Bedeutung von IE-1 und pp65

Desweiteren ist es wichtig zu beachten, dass die T-Zell-Antworten gegen lediglich zwei immun-dominante HCMV-Proteine gemessen wurden. Zwar wird mit einiger Berechtigung angenommen, dass es sich bei diesen Proteinen um wichtige Zielstrukturen in HCMV handelt. Ihr Stellenwert kann allerdings erst richtig abgeschätzt werden, wenn andere potentiell immunogene HCMV-Proteine wie pp150, pp28 oder gB in ähnlicher Weise - idealerweise vergleichend in einem größeren Patientenkollektiv - untersucht werden.

5.3.6. Verwendung von Vorhersagen

Für den Grossteil der hier als immunogen identifizierten Peptide konnte eine Vorhersage der präsentierenden HLA-Allele durchgeführt werden. Diese Analyse beruhte v.a. auf der Übereinstimmung von HLA-Allelen bei Patienten bzw. Probanden, die auf die gleichen Peptide reagier-

ten, unterstützt von den Ergebnissen der Bindungsmotiv-Analyse durch die online-Datenbanken „SYFPEITHI“ und „BIMAS“. Eine solche Analyse allein auf der Grundlage dieser Datenbanken erscheint uns zur Zeit wenig ratsam. Für das bekannte HLA-B7-restringierte Epitop CRVLCCYVL etwa, das in den IE-1-Peptiden 77 und 78 enthalten ist, wurde von beiden Datenbanken HLA-B*2705 mit hoher Wahrscheinlichkeit als präsentierendes Allel angegeben. HLA-B7 erhielt dagegen sehr schlechte Ergebnisse. Die vorhergesagten immunogenen Nonamere unterschieden sich zudem bei beiden Datenbanken. Komplex war v.a. das Bild, das sich nach dieser Identifikation ergab. Für eine Vielzahl von Peptiden konnte gezeigt werden, dass sie von mehreren HLA-Allelen präsentiert wurden. Dies ist wahrscheinlich auf unterschiedliche immunogene Nonamere zurückzuführen, die gleichzeitig in einem Pentadecapeptid enthalten sein können. In einem Teil der Fälle könnte es sich aber auch um gleiche Nonamere gehandelt haben. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Zusammenfassung von MHC-Klasse-I-Allelen zu sog. Supertypen auf der Basis struktureller Ähnlichkeiten in der Antigen-Bindungsgrube, gemeinsamer Peptid-Bindungsmotive und Bindungsanker sowie der Identifikation von Peptiden, die mit einigen dieser Allele kreuzreagieren können, befasst. So sind z.B. ein HLA-A2-, A3-, B7- oder B44-Supertyp beschrieben worden [81, 82, 83, 84, 85]. Manche der von Sette und Mitarbeitern für diese Versuche hergestellten synthetischen Peptide konnten dabei von bis zu fünf verschiedenen HLA-Allelen gebunden werden [85]. Für einen Teil der Peptide, die wir als von mehreren HLA-Allelen präsentiert beschrieben haben, könnte dies ebenso zutreffen; die Peptide IE-1₁₉₃₋₂₀₇ und IE-1₁₉₇₋₂₁₁ (Peptide 49 und 50) kämen dafür z.B. in Frage. Die „Restriktionsanalyse“ legte für diese Peptide nahe, dass das gleiche immunogene Nonamer sowohl von HLA-B8 als auch von HLA-B18 präsentiert werden könnte. Eine Möglichkeit herauszufinden, welches jeweils die tatsächlichen immunogenen Nonamer-Sequenzen sind, besteht in der Fein-Kartierung mit sich um jeweils eine Aminosäure überlappenden Nonameren, wie von Kern und Mitarbeitern publiziert [30]. Für einen Teil der in dieser Arbeit identifizierten Peptide wurde diese Fein-Kartierung im Anschlussprojekt bereits durchgeführt. Ist das Nonamer identifiziert, kann das präsentierende HLA-Allel durch einen Vergleich reagierender Probanden, durch einen Zytotoxassay oder direkt durch die Generierung von Tetrameren verifiziert werden. Die beiden letztgenannten Verfahren sind aber relativ aufwendig.

Die Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der HLA-Allele in der Stichprobe ergab, dass sich diese nur für wenige Allele signifikant von der der mitteleuropäischen Durchschnittsbevölkerung unterschied. Die in der Stichprobe gemachten Ergebnisse sollten also der Situation in der Gesamtbevölkerung entsprechen oder zumindest relativ ähnlich sein. Der statistisch valide Nach-

weis, dass Patienten und gesunde Probanden der gleichen Grundgesamtheit entstammen (sich also hinsichtlich der Struktur ihrer T-Zell-Antworten gegen IE-1 und pp65 nicht unterscheiden), konnte aufgrund der zu unterschiedlichen Altersstruktur in Patienten- und Probandengruppe hier aber nicht erbracht werden.

5.4. Schlussfolgerungen aus der Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung

Einleitend muss nochmals betont werden, dass eine Reihe der oben aufgeworfenen Fragen wie die Korrelation der HCMV-Reaktivierung mit Haupt-T-Zell-Zielstruktur, Anzahl der IE-1 bzw. -pp65-Epitope, dominanter T-Zell-Subpopulation usw. in der Patientengruppe zwar untersucht wurden, sich aber für keine davon statistisch signifikante Zusammenhänge ergaben. Wir führten dies v.a. auf die komplexen, recht vielschichtigen Ergebnisse in Kombination mit kleinen Fallzahlen zurück. Die nachfolgenden Überlegungen haben deshalb hypothetischen Charakter. Mit den hier vorgestellten Techniken sollen aber verschiedene Hypothesen in Folgestudien an einer größeren Patientenzahl verifiziert werden.

5.4.1. Klinische Implikationen der gemachten Beobachtungen

Bei Pt-7 zeigte sich, dass sich seine T-Zell-Antwort gegen pp65 aus sehr schwachen und sehr starken Reaktionen zusammensetzte. Welche Rolle solch schwachen T-Zell-Antworten gegen einzelne Epitope in der Kontrolle der Infektion zukommt, bleibt unklar. Prinzipiell stellt sich diese Frage aber für jede T-Zell-Antwort, unabhängig davon, welche Frequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen werden. Eine einfache Beziehung nach der Art: „je grösser die Frequenz HCMV-spezifischer T-Zellen desto besser der Schutz vor einer HCMV-Erkrankung“ scheint es in dieser Weise nicht zu geben. Pt-15 hatte beispielsweise in dem Zeitraum, als bei ihm eine HCMV-Gastritis diagnostiziert wurde (um die 5. Woche nach Transplantation), pp65-spezifische T-Zell-Frequenzen um 0.5 %; seine T-Zell-Antwort richtete sich dabei gegen drei CD8⁺ Epitope und ein CD4⁺ Epitop in pp65. Die meisten anderen Patienten erkrankten nicht, auch wenn bei ihnen zu vergleichbaren Zeitpunkten z.T. deutlich kleinere Frequenzen HCMV-spezifischer T-Zellen gemessen wurden. Die Definition „protektiver T-Zell-Frequenzen“ ist also mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Sie wird, wie oben angedeutet, durch die zu beobachtenden grossen Unterschiede in den Dosis-Wirkungsbeziehungen sowohl zwischen verschiedenen Peptiden als auch verschiedenen Patienten noch zusätzlich erschwert. Gleichwohl ist die Abhängigkeit des Schutzes vor HCMV-Reaktivierung bzw. -Erkrankung von der Frequenz Anti-

gen-spezifischer T-Zellen evident. Sie wird nicht zuletzt durch ein hohes Risiko für HCMV-Erkrankungen (v.a. Retinitis und interstitielle Pneumonie) bei HIV-infizierten Patienten belegt, deren CD4⁺ T-Zell-Frequenzen 100/μl unterschreiten [11].

Eine weitere wichtige Frage ist, welche klinischen Implikationen die Immundominanz von IE-1 bzw. pp65 hat. Patienten, bei denen die IE-1-Antworten dominierten (8 von 20 Patienten), schienen besser vor HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung geschützt zu sein, als Patienten, die stärkere T-Zell-Reaktionen gegen pp65 hatten. Bei einem Grossteil dieser Patienten (5 von 8) wurde keinerlei Reaktivierung beobachtet. Drei von acht Patienten hatten lediglich Episoden symptomloser Reaktivierung. Obwohl dies bei der kleinen Fallzahl statistisch nicht signifikant war, erschien uns die Tendenz bemerkenswert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass IE-1 als immediate-early-Genprodukt in der sehr frühen Phase des Replikationszyklus exprimiert ist. Da die Halbwertszeit eines peptidbeladenen MHC-Klasse-I-Moleküls auf der Zelloberfläche ca. 6 h beträgt, müssten IE-1-spezifische T-Zellen ihre Zielzellen v.a. in der IE- und E-Phase des Replikationszyklus (der beim HCMV ca. 24 h dauert) erkennen und zerstören, also lange bevor infektiöses Virus produziert werden kann. Das Early-Phasen-Genprodukt pp65 ist durch seine starke Präsenz in der Zelle (als häufigstes Tegument-Protein und Hauptbestandteil der „dense bodies“) möglicherweise tatsächlich immunogener als IE-1. Ob pp65 die Immunogenität von IE-1 durch Phosphorylierung zu reduzieren vermag, ist vermutet, aber nie bestätigt worden [54]. Wenn T-Zellen pp65-Peptide erkennen, kommen sie aber möglicherweise „zu spät“ - infektiöses Virus ist schon gebildet oder sogar freigesetzt worden. Von diesem Standpunkt aus betrachtet erschiene die verschieden starke Immunogenität der Proteine durchaus plausibel: das Virus könnte sich eine hohe Immunogenität von pp65 gewissermassen leisten, würde sich aber „bemühen“, IE-1 dem Zugriff der T-Zellen möglichst effektiv zu entziehen. Dazu würde die Beobachtung passen, dass die T-Zellen der Patienten im Median deutlich weniger IE-1-Epitope erkannten, als dies bei pp65 der Fall war (in der untersuchten Patientengruppe betrug der Median der T-Zell-Epitope eines in IE-1 gegenüber drei in pp65). Die Anzahl der Epitope, die bisher insgesamt in IE-1 identifiziert worden sind, ist ebenfalls deutlich kleiner als bei pp65, obwohl die Primärstruktur von IE-1 nur um 15 % kürzer ist (vgl. Abb. 11 und 12, S.53-54). Hinzu kommt die Beobachtung, dass HCMV-seropositive Patienten, die nicht gegen pp65 mit einer T-Zell-Antwort reagieren, seltener sind als dies für IE-1 der Fall ist (in der hier untersuchten Patientengruppe 0 % gegenüber 25 %). Wenn die Beobachtung tatsächlich zutrifft, dass Patienten mit ausgeprägten T-Zell-Antworten gegen IE-1 einen besseren Schutz vor HCMV-Erkrankung genießen, gäbe es also einige Erklärungsansätze dafür.

Einige Patienten hatten weitaus stärkere CD4⁺ als CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen pp65 (Pt-10, Pt-43). Welches Gewicht letztlich den beiden T-Zell-Subpopulationen jeweils bei der Kontrolle des Virus zukommt, ist beim Menschen bisher nicht ausreichend untersucht. Polic und Mitarbeiter haben diese Frage aber detailliert im MCMV-Modell studiert [86]. Sie konnten demonstrieren, dass die immunologischen Funktionen MCMV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie von NK-Zellen hierarchisch und redundant organisiert sind. Eine MCMV-Reaktivierung war selten, wenn nur eine dieser Subpopulationen in den Versuchstieren depletiert wurde. Wurden NK-Zellen und eine weitere Subpopulation depletiert, erwiesen sich die CD8⁺ T-Zellen als weitaus effektiver in der Kontrolle des Virus als CD4⁺ T-Zellen. Auch wenn die CD4⁺ T-Zellen in der Lage waren, die Vermehrung einzuschränken, war in 100 % der Mäuse eine Virusreplikation nachweisbar. Bei CD4⁺ und NK-Zell-depletierten Tieren konnte dagegen nur in 25 % der Mäuse eine Reaktivierung beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, dass auch im Menschen den CD8⁺ T-Zellen die massgebliche Rolle in der Kontrolle der HCMV-Infektion zukommt, unterstützt von NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen. Komanduri und Mitarbeiter konnten eine Korrelation zwischen HCMV-Erkrankung und dem Verlust HCMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Zuge progressiver HIV-Infektion zeigen [11]. In zwei Anfang 2002 veröffentlichten Arbeiten wurde ein Immunmonitoring von HCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei KMT-Patienten vorgestellt [46, 47]. Beide Arbeiten zeigten eine starke Korrelation zwischen der Rekonstitution HCMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und dem Schutz vor HCMV-Erkrankung. Dieses Ergebnis ist nicht allzu überraschend, wurde doch zuvor schon in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass die Erholung der CD8⁺ T-Zellen insgesamt gut mit dem Schutz vor HCMV korreliert [5, 6]. Als wesentlicher Kritikpunkt an diesem Ansatz ist aber anzuführen, dass lediglich einzelne antigene Determinanten isoliert beobachtet wurden, nicht die gesamte T-Zell-Antwort.

5.4.2. *Resümé*

Zwei der drei in dieser Arbeit verfolgten Ziele wurden erreicht: die Schaffung der technischen Voraussetzungen, um aus einem Minimum an Material die T-Zell-Antwort gegen immundominante Proteine in Antworten gegen einzelne antigene Determinanten, und, wenn gewünscht, auch in Antworten einzelner Klone, aufzugliedern, sowie die Anwendung dieser Techniken bei immunsupprimierten Patienten mit dem Ziel, die T-Zell-Antwort gegen die beiden vielleicht wichtigsten T-Zell-Zielstrukturen in HCMV, IE-1 und pp65, zu untersuchen. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse die Aussage zu, dass die T-Zell-Antwort gegen diese Zielstrukturen von überaus komplexer Natur ist. Das dritte Ziel, die Unterschiede zwischen den Patienten hinsichtlich

HCMV-Reaktivierung und -Erkrankung auf die beobachteten grossen Unterschiede in der T-Zell-Antwort zurückzuführen, wurde nicht erreicht. Obwohl die Beobachtung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer T-Zell-Antwort gegen IE-1 und Schutz vor HCMV-Reaktivierung interessant ist, wirft die unerwartet grosse Komplexität der gemachten Beobachtungen eine Reihe neuer Fragen auf, deren Beantwortung derzeit schwierig erscheint.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Mocarski, E. S., Jr. and Kemble, G. W. (1996): Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis, *Intervirology* (vol. 39), No. 5-6, pp. 320-30.
- [2] Prosch, S.; Wendt, C. E.; Reinke, P.; Priemer, C.; Oppert, M.; Kruger, D. H.; Volk, H. D. and Docke, W. D. (2000): A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation, *Virology* (vol. 272), No. 2, pp. 357-65.
- [3] Mehta, S. K.; Stowe, R. P.; Feiveson, A. H.; Tyring, S. K. and Pierson, D. L. (2000): Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight, *J Infect Dis* (vol. 182), No. 6, pp. 1761-4.
- [4] Rubin, R. H. (2000): Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients, *Transpl Infect Dis* (vol. 2), No. 3, pp. 99-100.
- [5] Quinnan, G. V., Jr.; Kirmani, N.; Rook, A. H.; Manischewitz, J. F.; Jackson, L.; Moreschi, G.; Santos, G. W.; Saral, R. and Burns, W. H. (1982): Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients, *N Engl J Med* (vol. 307), No. 1, pp. 7-13.
- [6] Rook, A. H.; Smith, W. J.; Burdick, J. F.; Manischewitz, J. F.; Frederick, W.; Siegel, J. P.; Williams, G. M. and Quinnan, G. V. (1984): Virus-specific cytotoxic lymphocyte responses are predictive of the outcome of cytomegalovirus infection of renal transplant recipients, *Transplant Proc* (vol. 16), No. 6, pp. 1466-9.
- [7] Reddehase, M. J.; Weiland, F.; Munch, K.; Jonjic, S.; Luske, A. and Koszinowski, U. H. (1985): Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs, *J Virol* (vol. 55), No. 2, pp. 264-73.
- [8] Reddehase, M. J.; Mutter, W.; Munch, K.; Buhning, H. J. and Koszinowski, U. H. (1987): CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity, *J Virol* (vol. 61), No. 10, pp. 3102-8.
- [9] Riddell, S. R.; Watanabe, K. S.; Goodrich, J. M.; Li, C. R.; Agha, M. E. and Greenberg, P. D. (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones, *Science* (vol. 257), No. 5067, pp. 238-41.
- [10] Walter, E. A.; Greenberg, P. D.; Gilbert, M. J.; Finch, R. J.; Watanabe, K. S.; Thomas, E. D. and Riddell, S. R. (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor, *N Engl J Med* (vol. 333), No. 16, pp. 1038-44.
- [11] Komanduri, K. V.; Viswanathan, M. N.; Wieder, E. D.; Schmidt, D. K.; Bredt, B. M.; Jacobson, M. A. and McCune, J. M. (1998): Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1, *Nat Med* (vol. 4), No. 8, pp. 953-6.
- [12] Einsele, H.; Roosnek, E.; Rufer, N.; Sinzger, C.; Riegler, S.; Loffler, J.; Grigoleit, U.; Moris, A.; Rammensee, H. G.; Kanz, L.; Kleihauer, A.; Frank, F.; Jahn, G. and Hebart, H. (2002): Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy, *Blood* (vol. 99), No. 11, pp. 3916-22.
- [13] Borysiewicz, L. K.; Hickling, J. K.; Graham, S.; Sinclair, J.; Cranage, M. P.; Smith, G. L. and Sissons, J. G. (1988): Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early

- protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses, *J Exp Med* (vol. 168), No. 3, pp. 919-31.
- [14] Borysiewicz, L. K.; Graham, S.; Hickling, J. K.; Mason, P. D. and Sissons, J. G. (1988): Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity, *Eur J Immunol* (vol. 18), No. 2, pp. 269-75.
 - [15] Alp, N. J.; Allport, T. D.; Van Zanten, J.; Rodgers, B.; Sissons, J. G. and Borysiewicz, L. K. (1991): Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein, *J Virol* (vol. 65), No. 9, pp. 4812-20.
 - [16] Thomsen, D. R.; Stenberg, R. M.; Goins, W. F. and Stinski, M. F. (1984): Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 81), No. 3, pp. 659-63.
 - [17] Borysiewicz, L. K.; Morris, S.; Page, J. D. and Sissons, J. G. (1983): Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirements for in vitro generation and specificity, *Eur J Immunol* (vol. 13), No. 10, pp. 804-9.
 - [18] Grefte, J. M.; van der Gun, B. T.; Schmolke, S.; van der Giessen, M.; van Son, W. J.; Plachter, B.; Jahn, G. and The, T. H. (1992): The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection, *J Gen Virol* (vol. 73), No. Pt 11, pp. 2923-32.
 - [19] McLaughlin-Taylor, E.; Pande, H.; Forman, S. J.; Tanamachi, B.; Li, C. R.; Zaia, J. A.; Greenberg, P. D. and Riddell, S. R. (1994): Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus-specific cytotoxic T lymphocytes, *J Med Virol* (vol. 43), No. 1, pp. 103-10.
 - [20] Riddell, S. R.; Rabin, M.; Geballe, A. P.; Britt, W. J. and Greenberg, P. D. (1991): Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression, *J Immunol* (vol. 146), No. 8, pp. 2795-804.
 - [21] Irmiere, A. and Gibson, W. (1983): Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus, *Virology* (vol. 130), No. 1, pp. 118-33.
 - [22] Wills, M. R.; Carmichael, A. J.; Mynard, K.; Jin, X.; Weekes, M. P.; Plachter, B. and Sissons, J. G. (1996): The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL, *J Virol* (vol. 70), No. 11, pp. 7569-79.
 - [23] Weekes, M. P.; Wills, M. R.; Mynard, K.; Carmichael, A. J. and Sissons, J. G. (1999): The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo, *J Virol* (vol. 73), No. 3, pp. 2099-108.
 - [24] Weekes, M. P.; Carmichael, A. J.; Wills, M. R.; Mynard, K. and Sissons, J. G. (1999): Human CD28-CD8⁺ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones, *J Immunol* (vol. 162), No. 12, pp. 7569-77.
 - [25] Weekes, M. P.; Wills, M. R.; Mynard, K.; Hicks, R.; Sissons, J. G. and Carmichael, A. J. (1999): Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57⁺ CD28⁻ CD8⁺ T-cell population, *Immunology* (vol. 98), No. 3, pp. 443-9.
 - [26] Bitmansour, A. D.; Waldrop, S. L.; Pitcher, C. J.; Khatamzas, E.; Kern, F.; Maino, V. C. and Picker, L. J. (2001): Clonotypic structure of the human CD4⁺ memory T cell response to cytomegalovirus, *J Immunol* (vol. 167), No. 3, pp. 1151-63.
 - [27] Frankenberg, N.; Pepperl-Klindworth, S.; Meyer, R. G. and Plachter, B. (2002):

- Identification of a conserved HLA-A2-restricted decapeptide from the IE1 protein (pUL123) of human cytomegalovirus, *Virology* (vol. 295), No. 2, pp. 208-16.
- [28] Gautier, N.; Chavant, E.; Prieur, E.; Monsarrat, B.; Mazarguil, H.; Davrinche, C.; Gairin, J. E. and Davignon, J. L. (1996): Characterization of an epitope of the human cytomegalovirus protein IE1 recognized by a CD4⁺ T cell clone, *Eur J Immunol* (vol. 26), No. 5, pp. 1110-7.
 - [29] Gavin, M. A.; Gilbert, M. J.; Riddell, S. R.; Greenberg, P. D. and Bevan, M. J. (1993): Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes, *J Immunol* (vol. 151), No. 8, pp. 3971-80.
 - [30] Kern, F.; Surel, I. P.; Brock, C.; Freistedt, B.; Radtke, H.; Scheffold, A.; Blasczyk, R.; Reinke, P.; Schneider-Mergener, J.; Radbruch, A.; Walden, P. and Volk, H. D. (1998): T-cell epitope mapping by flow cytometry, *Nat Med* (vol. 4), No. 8, pp. 975-8.
 - [31] Kern, F.; Surel, I. P.; Faulhaber, N.; Frommel, C.; Schneider-Mergener, J.; Schonnemann, C.; Reinke, P. and Volk, H. D. (1999): Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited, *J Virol* (vol. 73), No. 10, pp. 8179-84.
 - [32] Kern, F.; Bunde, T.; Faulhaber, N.; Kiecker, F.; Khatamzas, E.; Rudawski, I. M.; Pruss, A.; Gratama, J. W.; Volkmer-Engert, R.; Ewert, R.; Reinke, P.; Volk, H. D. and Picker, L. J. (2002): Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals, *J Infect Dis* (vol. 185), No. 12, pp. 1709-16.
 - [33] Khattab, B. A.; Lindenmaier, W.; Frank, R. and Link, H. (1997): Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes, *J Med Virol* (vol. 52), No. 1, pp. 68-76.
 - [34] Kuzushima, K.; Hayashi, N.; Kimura, H. and Tsurumi, T. (2001): Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay, *Blood* (vol. 98), No. 6, pp. 1872-81.
 - [35] Longmate, J.; York, J.; La Rosa, C.; Krishnan, R.; Zhang, M.; Senitzer, D. and Diamond, D. J. (2001): Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes, *Immunogenetics* (vol. 52), No. 3-4, pp. 165-73.
 - [36] Masuoka, M.; Yoshimuta, T.; Hamada, M.; Okamoto, M.; Fumimori, T.; Honda, J.; Oizumi, K. and Itoh, K. (2001): Identification of the HLA-A24 peptide epitope within cytomegalovirus protein pp65 recognized by CMV-specific cytotoxic T lymphocytes, *Viral Immunol* (vol. 14), No. 4, pp. 369-77.
 - [37] Reddehase, M. J. (2000): The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses, *Curr Opin Immunol* (vol. 12), No. 6, p. 738.
 - [38] Retiere, C.; Prod'homme, V.; Imbert-Marcille, B. M.; Bonneville, M.; Vie, H. and Hallet, M. M. (2000): Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response, *J Virol* (vol. 74), No. 9, pp. 3948-52.
 - [39] Davignon, J. L.; Castanie, P.; Yorke, J. A.; Gautier, N.; Clement, D. and Davrinche, C. (1996): Anti-human cytomegalovirus activity of cytokines produced by CD4⁺ T-cell clones specifically activated by IE1 peptides in vitro, *J Virol* (vol. 70), No. 4, pp. 2162-9.
 - [40] Solache, A.; Morgan, C. L.; Dodi, A. I.; Morte, C.; Scott, I.; Baboonian, C.; Zal, B.; Goldman, J.; Grundy, J. E. and Madrigal, J. A. (1999): Identification of three HLA-

- A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus, *J Immunol* (vol. 163), No. 10, pp. 5512-8.
- [41] Khan, N.; Cobbold, M.; Keenan, R. and Moss, P. A. (2002): Comparative analysis of CD8⁺ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype, *J Infect Dis* (vol. 185), No. 8, pp. 1025-34.
 - [42] Gyulai, Z.; Endresz, V.; Burian, K.; Pincus, S.; Toldy, J.; Cox, W. I.; Meric, C.; Plotkin, S.; Gonczol, E. and Berencsi, K. (2000): Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs, *J Infect Dis* (vol. 181), No. 5, pp. 1537-46.
 - [43] Kern, F.; Khatamzas, E.; Sural, I.; Frommel, C.; Reinke, P.; Waldrop, S. L.; Picker, L. J. and Volk, H. D. (1999): Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms, *Eur J Immunol* (vol. 29), No. 9, pp. 2908-15.
 - [44] Gillespie, G. M.; Wills, M. R.; Appay, V.; O'Callaghan, C.; Murphy, M.; Smith, N.; Sissons, P.; Rowland-Jones, S.; Bell, J. I. and Moss, P. A. (2000): Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors, *J Virol* (vol. 74), No. 17, pp. 8140-50.
 - [45] Sandberg, J. K.; Fast, N. M. and Nixon, D. F. (2001): Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8⁺ T lymphocytes, *J Immunol* (vol. 167), No. 1, pp. 181-7.
 - [46] Gratama, J. W.; van Esser, J. W.; Lamers, C. H.; Tournay, C.; Lowenberg, B.; Bolhuis, R. L. and Cornelissen, J. J. (2001): Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection, *Blood* (vol. 98), No. 5, pp. 1358-64.
 - [47] Hebart, H.; Deginik, S.; Stevanovic, S.; Grigoleit, U.; Dobler, A.; Baur, M.; Rauser, G.; Sinzger, C.; Jahn, G.; Loeffler, J.; Kanz, L.; Rammensee, H. G. and Einsele, H. (2002): Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation, *Blood* (vol. 99), No. 10, pp. 3830-7.
 - [48] Heise, W. (Edit.) (1998): *Die CMV-Erkrankung - Klinisches Krankheitsspektrum, Diagnose und Therapie*, 1. ed., Media Bibliothek, Pharmacia & Upjohn.
 - [49] Emery, V. C.; Cope, A. V.; Bowen, E. F.; Gor, D. and Griffiths, P. D. (1999): The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo, *J Exp Med* (vol. 190), No. 2, pp. 177-82.
 - [50] Sissons, J. G.; Bain, M. and Wills, M. R. (2002): Latency and reactivation of human cytomegalovirus, *J Infect* (vol. 44), No. 2, pp. 73-7.
 - [51] Rasmussen, L. (1999): Molecular pathogenesis of human cytomegalovirus infection, *Transpl Infect Dis* (vol. 1), No. 2, pp. 127-34.
 - [52] de Ory Manchon, F.; Sanz Moreno, J. C.; Castaneda Lopez, R.; Ramirez Fernandez, R.; Leon Rega, P. and Pachon del Amo, I. (2001): [Cytomegalovirus seroepidemiology in the community of Madrid], *Rev Esp Salud Publica* (vol. 75), No. 1, pp. 55-62.
 - [53] Loenen, W. A.; Bruggeman, C. A. and Wiertz, E. J. (2001): Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology, *Semin Immunol* (vol.

- 13), No. 1, pp. 41-9.
- [54] Gilbert, M. J.; Riddell, S. R.; Plachter, B. and Greenberg, P. D. (1996): Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product, *Nature* (vol. 383), No. 6602, pp. 720-2.
 - [55] Docke, W. D.; Prosch, S.; Fietze, E.; Kimel, V.; Zuckermann, H.; Klug, C.; Syrbe, U.; Kruger, D. H.; von Baehr, R. and Volk, H. D. (1994): Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor, *Lancet* (vol. 343), No. 8892, pp. 268-9.
 - [56] Fietze, E.; Prosch, S.; Reinke, P.; Stein, J.; Docke, W. D.; Staffa, G.; Loning, S.; Devaux, S.; Emmrich, F.; von Baehr, R. and et al. (1994): Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor, *Transplantation* (vol. 58), No. 6, pp. 675-80.
 - [57] Grangeot-Keros, L. and Cointe, D. (2001): Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection, *J Clin Virol* (vol. 21), No. 3, pp. 213-21.
 - [58] Grauhan, O.; Muller, J.; Pfitzmann, R.; Knosalla, C.; Siniawski, H.; Fietze, E.; Volk, H. D. and Hetzer, R. (1997): Humoral rejection after heart transplantation: reliability of intramyocardial electrogram recordings (IMEG) and myocardial biopsy, *Transpl Int* (vol. 10), No. 6, pp. 439-45.
 - [59] Plotkin, S. A.; Farquhar, J. and Horberger, E. (1976): Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus, *J Infect Dis* (vol. 134), No. 5, pp. 470-5.
 - [60] Diamond, D. J.; York, J.; Sun, J. Y.; Wright, C. L. and Forman, S. J. (1997): Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection, *Blood* (vol. 90), No. 5, pp. 1751-67.
 - [61] Grossi, P. and Baldanti, F. (1997): Treatment of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus infection, *J Nephrol* (vol. 10), No. 3, pp. 146-51.
 - [62] Harty, J. T.; Tvinnereim, A. R. and White, D. W. (2000): CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection, *Annu Rev Immunol* (vol. 18), pp. 275-308.
 - [63] Picker, L. J.; Singh, M. K.; Zdraveski, Z.; Treer, J. R.; Waldrop, S. L.; Bergstresser, P. R. and Maino, V. C. (1995): Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry, *Blood* (vol. 86), No. 4, pp. 1408-19.
 - [64] Rammensee, H. G.; Bachmann, J. and Stevanovic, S. (1997): MHC Ligands and Peptide Motifs, *Landes Bioscience* (vol. 1), No. 6, pp. 905-11.
 - [65] Fields, G. B. and Noble, R. L. (1990): Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int J Pept Protein Res* (vol. 35), No. 3, pp. 161-214.
 - [66] Waldrop, S. L.; Pitcher, C. J.; Peterson, D. M.; Maino, V. C. and Picker, L. J. (1997): Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency, *J Clin Invest* (vol. 99), No. 7, pp. 1739-50.
 - [67] Hoffmeister, B.; Kiecker, F.; Surel, I.; Khatamzas, E.; Schuster, V.; Volk, H.D., Kern, F. (2002): Evaluation of the frequency of virus-specific CD8+ T cells by cytokine flow cytometry, *Körholz, D. and Kiess, W., Cytokines and Colony Stimulating Factors - Methods and Protocols* (vol. 215).
 - [68] Hoffmeister, B.; Kiecker, Tesfa, L., V., Volk, H.D., Picker, L.J., Kern, F. (2003): Methods for mapping T cell epitopes by flow cytometry (vol. in press).
 - [69] Hoffmeister, B.; Kiecker, F.; Surel, I.; Khatamzas, E.; Schuster, V.; Volk, H. D. and Kern, F. (2003): Evaluation of the frequency of virus-specific CD8+ T cells by cytokine flow cytometry, *Methods Mol Biol* (vol. 215), pp. 59-69.

- [70] Muche, J. M.; Lukowsky, A.; Asadullah, K.; Gellrich, S. and Sterry, W. (1997): Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma, *Blood* (vol. 90), No. 4, pp. 1636-42.
- [71] Lukowsky, A.; Richter, S.; Dijkstal, K.; Sterry, W. and Muche, J. M. (2002): A T-cell receptor gamma polymerase chain reaction assay using capillary electrophoresis for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphomas, *Diagn Mol Pathol* (vol. 11), No. 2, pp. 59-66.
- [72] Suni, M. A.; Picker, L. J. and Maino, V. C. (1998): Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry, *J Immunol Methods* (vol. 212), No. 1, pp. 89-98.
- [73] Nomura, L. E.; Walker, J. M. and Maecker, H. T. (2000): Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells, *Cytometry* (vol. 40), No. 1, pp. 60-8.
- [74] Waldrop, S. L.; Davis, K. A.; Maino, V. C. and Picker, L. J. (1998): Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis, *J Immunol* (vol. 161), No. 10, pp. 5284-95.
- [75] Ljungman, P.; Griffiths, P. and Paya, C. (2002): Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients, *Clin Infect Dis* (vol. 34), No. 8, pp. 1094-7.
- [76] Argaet, V. P.; Schmidt, C. W.; Burrows, S. R.; Silins, S. L.; Kurilla, M. G.; Doolan, D. L.; Suhrbier, A.; Moss, D. J.; Kieff, E.; Sucley, T. B. and et al. (1994): Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus, *J Exp Med* (vol. 180), No. 6, pp. 2335-40.
- [77] Utz, U.; Banks, D.; Jacobson, S. and Biddison, W. E. (1996): Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion, *J Virol* (vol. 70), No. 2, pp. 843-51.
- [78] Kalams, S. A.; Johnson, R. P.; Trocha, A. K.; Dynan, M. J.; Ngo, H. S.; D'Aquila, R. T.; Kurnick, J. T. and Walker, B. D. (1994): Longitudinal analysis of T cell receptor (TCR) gene usage by human immunodeficiency virus 1 envelope-specific cytotoxic T lymphocyte clones reveals a limited TCR repertoire, *J Exp Med* (vol. 179), No. 4, pp. 1261-71.
- [79] Betts, M. R.; Casazza, J. P.; Patterson, B. A.; Waldrop, S.; Trigona, W.; Fu, T. M.; Kern, F.; Picker, L. J. and Koup, R. A. (2000): Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype, *J Virol* (vol. 74), No. 19, pp. 9144-51.
- [80] Mason, P. M. and Parham, P. (1998): HLA class I region sequences, 1998, *Tissue Antigens* (vol. 51), No. 4 Pt 2, pp. 417-66.
- [81] Celis, E.; Fikes, J.; Wentworth, P.; Sidney, J.; Southwood, S.; Maewal, A.; Del Guercio, M. F.; Sette, A. and Livingston, B. (1994): Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles, *Mol Immunol* (vol. 31), No. 18, pp. 1423-30.
- [82] del Guercio, M. F.; Sidney, J.; Hermanson, G.; Perez, C.; Grey, H. M.; Kubo, R. T. and Sette, A. (1995): Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype, *J Immunol* (vol. 154), No. 2, pp. 685-93.
- [83] Sette, A. and Sidney, J. (1998): HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism, *Curr Opin Immunol* (vol. 10), No. 4, pp. 478-82.

- [84] Sette, A. and Sidney, J. (1999): Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism, *Immunogenetics* (vol. 50), No. 3-4, pp. 201-12.
- [85] Sidney, J.; Grey, H. M.; Southwood, S.; Celis, E.; Wentworth, P. A.; del Guercio, M. F.; Kubo, R. T.; Chesnut, R. W. and Sette, A. (1996): Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules, *Hum Immunol* (vol. 45), No. 2, pp. 79-93.
- [86] Polic, B.; Hengel, H.; Krmpotic, A.; Trgovcich, J.; Pavic, I.; Luccaronin, P.; Jonjic, S. and Koszinowski, U. H. (1998): Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection, *J Exp Med* (vol. 188), No. 6, pp. 1047-54.

Anhang

Danksagung

Typische Schwierigkeiten, denen Doktoranden häufig bei ihrer Dissertation begegnen, sind mangelnde Kommunikation zwischen Mitarbeitern, Abteilungen oder Instituten, ein abwesender Betreuer oder ein unerreichbarer Doktorvater. Nichts dergleichen traf für diese Arbeit zu. Schon deswegen ist diese Danksagung mehr als eine reine Formsache.

Zuerst möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die uns ihr Blut regelmäßig zur Verfügung gestellt haben und damit die Grundlage für diese Arbeit geschaffen haben. Ohne die Mitarbeit des Teams der Transplantationsambulanz im DHZB, v.a. auch die reibungslose Organisation durch Heidi Kriegler, wäre diese Arbeit ebenfalls nicht zustande gekommen. Dirk Habedank war für uns da, wann immer klinische Fragen zu klären waren.

Bei Ansgar Lukowsky und seinen MitarbeiterInnen aus der Dermatologie möchte ich mich für die Durchführung der T-Zell-Rezeptor-PCRs bedanken.

Katharina Raba, Thoralf Kaiser und Barbara Holz knecht aus dem Rheumaforschungszentrum waren uns sehr bei der durchflusszytometrischen Sortierung HCMV-spezifischer T-Zellen behilflich.

Auch die Hilfe (und die ungezählten Blutspenden) meiner MitarbeiterInnen aus dem Institut, v.a. von Anke Bonke, Ingrid Jäkel, Christa Liebenthal, Ulrike Mönich, Kristin Neuhaus, Gantuja Bold, Lydia Tesfa und Peter Nickel war von grosser Bedeutung für die Arbeit. Allen meinen Doktoranden-Kollegen danke ich für die schöne Zeit und den Spaß, den wir zusammen hatten. Insbesondere Thorsten Bunde möchte ich für die intensive, anspruchsvolle, fruchtbare und vertrauensvolle Zusammenarbeit danken. Zu Dank verpflichtet bin ich auch Conny Höflich, die, wann immer nötig, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Betreuer, Florian Kern, gilt selbstverständlich mein besonderer Dank: so u.a. für den Freiraum und das Vertrauen, das uns in unserer Arbeitsgruppe entgegengebracht wird und nicht zuletzt für die vielen Ideen, die durch ihn in dieser Arbeit realisiert worden sind.

Schließlich möchte ich meinem Chef, Hans-Dieter Volk, für die Kultivierung eines freigeistigen und toleranten Ambientes in unserem Institut danken, ein Klima, in dem zu arbeiten ein echtes Privileg bedeutet.

Veröffentlichungen, Vorträge, Präsentationen

Aus dieser Arbeit sind bislang folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Präsentationen hervorgegangen:

- „Detection of antigen-specific T cells by cytokine flow cytometry: the use of whole blood may underestimate frequencies“, B. Hoffmeister, T. Bunde, I. M. Rudawsky, H.-D. Volk und F. Kern, European Journal of Immunology, Vol. 12, Wiley-VCH, Weinheim, 2003
- „Mapping T-cell epitopes by flow cytometry“, B. Hoffmeister, F. Kiecker, L. Tesfa, H.-D. Volk, L. J. Picker und F. Kern in Methods 29, Elsevier Science, Academic Press, 2003
- „Evaluation on the frequency of virus-specific CD8⁺ T-cells by cytokine flow cytometry“, B. Hoffmeister, F. Kiecker, I. Surel, E. Khatamzas, V. Schuster, H.-D. Volk und F. Kern in Methods of Molecular Biology, Vol. 215, Cytokines and Colony Stimulating Factors, Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, N.J., 2002
- „Highly efficient T-cell epitope mapping of HCMV-specific T-cells in heart and lung transplant patients“, B. Hoffmeister, A. Lukowsky, D. Habedank, H.-D. Volk und F. Kern, Vortrag und Poster-Präsentation, American Transplant Congress, Washington D.C., 2002
- Weitere Publikationen sind in Vorbereitung

Lebenslauf

Name: Bodo Hoffmeister
Geburtsort: Bad Oeynhausen
Geburtsdatum: 17.05.1975

Schul Ausbildung:

1981-1985 Grundschole Eidinghausen
1985-1994 Immanuel-Kant-Gymnasium Bad Oeynhausen
01.07.1994 Abitur

Zivildienst:

1994-1995 Herzzentrum Bad Oeynhausen (OP)

Hochschulausbildung:

1995-1998 Studium von Humanmedizin und Philosophie an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
01.07.1997 Physikum
seit April 1998 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
23.03.1999 1. Staatsexamen
03.04.2003 2. Staatsexamen
Okt. 2000-Okt. 2002 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von PD Dr. F. Kern in der Medizinischen Immunologie der Charité, Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Berlin, den 22.04.2003

Hiermit erkläre ich, Bodo Hoffmeister, an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Durchflusszytometrische Epitop-Kartierung HCMV-spezifischer T-Zellen herz- und lungentransplanterter Patienten“ von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.



Bodo Hoffmeister